EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

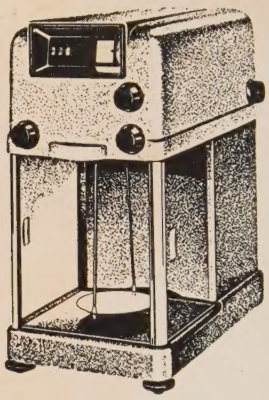
B. Saint-Guily: La dynamique des courants marins 337
G. Joyet und M. Miller: Die von den Leuchtzifferblättern herrührende Strahlendosis in der Schweiz 342

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

C. Giordano, J. Bloom, and J. P. Merrill: Preparation of Monoaminoxydase 346
P. G. Waser: Struktur und Wirkung von muscarinähnlichen Verbindungen 347
G. Ugazio: Paper Electrophoresis of Soluble Proteins of Rat Liver Mitochondria 349
J. G. Henrotte, G. Ranganathan, and G. Krishnamurthi: Normal Values of Plasma Potassium, Sodium, Cholesterol and Proteins and of Blood Glucose in South Indian People, in Reference to Western Standards 350
C.-S. Dongrozi: Propos sur une nouvelle moutarde azotée . . 351
V. V. Modi and (Miss) D. K. Patwa: Enzymatic Synthesis and Destruction of Carotenoids in Mango Extracts 352
R. M. Bernal, A. Villegas-Castillo, and O. P. Espejo: Studies on Philippine Species of Rauwolfia. 1. Isolation of Reserpine and Rescinnamine from *Rauwolfia amsoniaefolia* A. DC. 353
K. C. Kanwar: Note on the Specificity of Mercuric Bromophenol Blue for the Cytochemical Detection of Proteins 355
E. Vischer und A. Wettstein: Enzymatische Hydrierungen im Ring A von Steroiden mittels Streptomyzeten 355
E. J. Agnello, R. Pinson, Jr., S. K. Figdor, G. M. K. Hughes, H. W. Ordway, B. M. Bloom, and G. D. Laubach: The Synthesis of Corticosteroids Methylated at C_{21} 357
S. M. Siegel: Phenol-Mineral Interactions: The Oxidation of Pyrogallol and other *o*-Diphenols on Silica Gel 358
E. Retzlaff and Joan Fontaine: A Differential Staining Reaction Demonstrating Reciprocal Activity in Mauthner's Cells 359
Gertrud Ochs: Quantitativer Nachweis eines Abbaus von Zellulose und Lignin in der rollkranken Rebe 361
A. Bolognari: Aspetti del nucleolo di cellule normali e patologiche 361
Masao Yoshida: Maintenance of Visual Cells *in vitro* 363
H. K. Jain and S. B. Gupta: Genetic Nature of Self-Incompatibility in Annual Chrysanthemum 364
S. Dikstein and D. Birnbaum: The Mechanism of External Pancreatic Secretion 365
S. Di Bella: Absorption of L-Lysine in the Small Intestine of Rats 367
L. D. Hull, L. G. Eltherington, and A. Horita: The Antagonism of Adrenergic Blockade by Dichloroisoproterenol (DCI) 368
M. Goldstein, A. J. Friedhoff, S. B. Wortis, and S. B. Gertner: The Differences in the Accumulation and Metabolism of Catechol Amines in Heart and Liver 369
R. Jaques and R. Meier: Pharmacological Characteristics of Bradykinin B 371
K. F. Gey and A. Pletscher: Post Mortem Increase of 5-Hydroxytryptamine in Rat Brain after 5-Hydroxytryptophan Administration 372
J. M. van Rossum, with the assistance of M. J. W. J. Cornelissen, C. Th. P. de Groot, and J. A. Th. M. Hurkmans: A New View on an Old Drug: Pilocarpine 373
A. R. Fahmy, M. Talaat, and M. A. Zachary: Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase after Hepatic Artery Ligature . . 375
U. S. von Euler and F. Lishajko: Release of Noradrenaline from Adrenergic Transmitter Granules by Tyranine 376
F. Krejci, R. Thalmann und H. Bornschein: Der Einfluss der Reizbedingungen auf den initialen Abfall der Cochlearpotentiale bei totaler Ischämie 377
M. Brenner und A. Niederwieser: Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren (Studiorum Progressus) 378
F. Wegmüller, R. Becher, B. Hoffmann und H. R. Schenk: «Codeless Scanning», ein neues Verfahren der automatischen Dokumentation (Constructiones) 383

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



M 1

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XVI/8

Bios Laboratories, Inc., New York
Ciba AG., Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy A. G., Basel
F. Hoffman-La Roche & Co. AG., Basel
S. Karger A. G., Basel/New York
Lonza A. G., Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz A. G., Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 68.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 68.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogn libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 68.–. Il prezzo vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is fr. 68.–. Price in Swisscurrency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1960 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

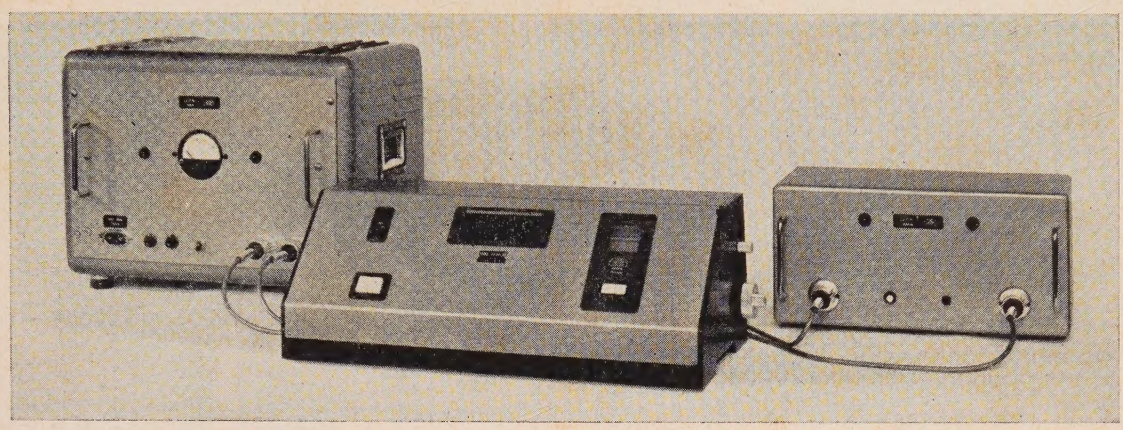
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/C

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

Lonza

Lösungsmittel
Methylacetat, Aethylacetat, Butylacetat, Lösungsmittelgemische, n-Butanol

Organische technische Produkte
Formaldehyd, Acetaldehyd, Paraldehyd, Crotonaldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Vinylacetat monomer, Anilinöl, Nitrobenzol, Dicyandiamid, Metaldehyd

Organische Zwischenprodukte
Acetessigäthylester, Acetessigmethylester, Phenylmethylpyrazolon, Acetessiganilid, Acetessig-o-chloranilid und andere Acetessigarylamide, Acetylaceton, Methyläthylpyridin, Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Acetonitril, Isobuttersäurenitril

Kunststoffe
Polyvinylchlorid in verschiedenen Qualitäten, Vinylchlorid/Vinylacetat-Mischpolymerisate, Polyvinylacetat-Dispersionen VIPOLIT® Polymethylmethacrylat in Platten VOS®

Stickstoffprodukte
Ammoniak, Salpetersäure, Ammonnitrat, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammonsulfat, Harnstoff

Stickstoff- und kombinierte Dünger
Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Kalkstickstoff, Ammonsulfat, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Nitrophosphatkali borhaltig, Volldünger Lonza®, Rebendünger Lonza®, Tabakdünger Lonza®, Lonzin® für Topfpflanzen, Composto Lonza®

Calciumcarbid

Ferro-Legierungen
Ferrosilicium, Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin®, Feralsit®), Ferrosilicium-Mangan-Aluminium (Simanal®)

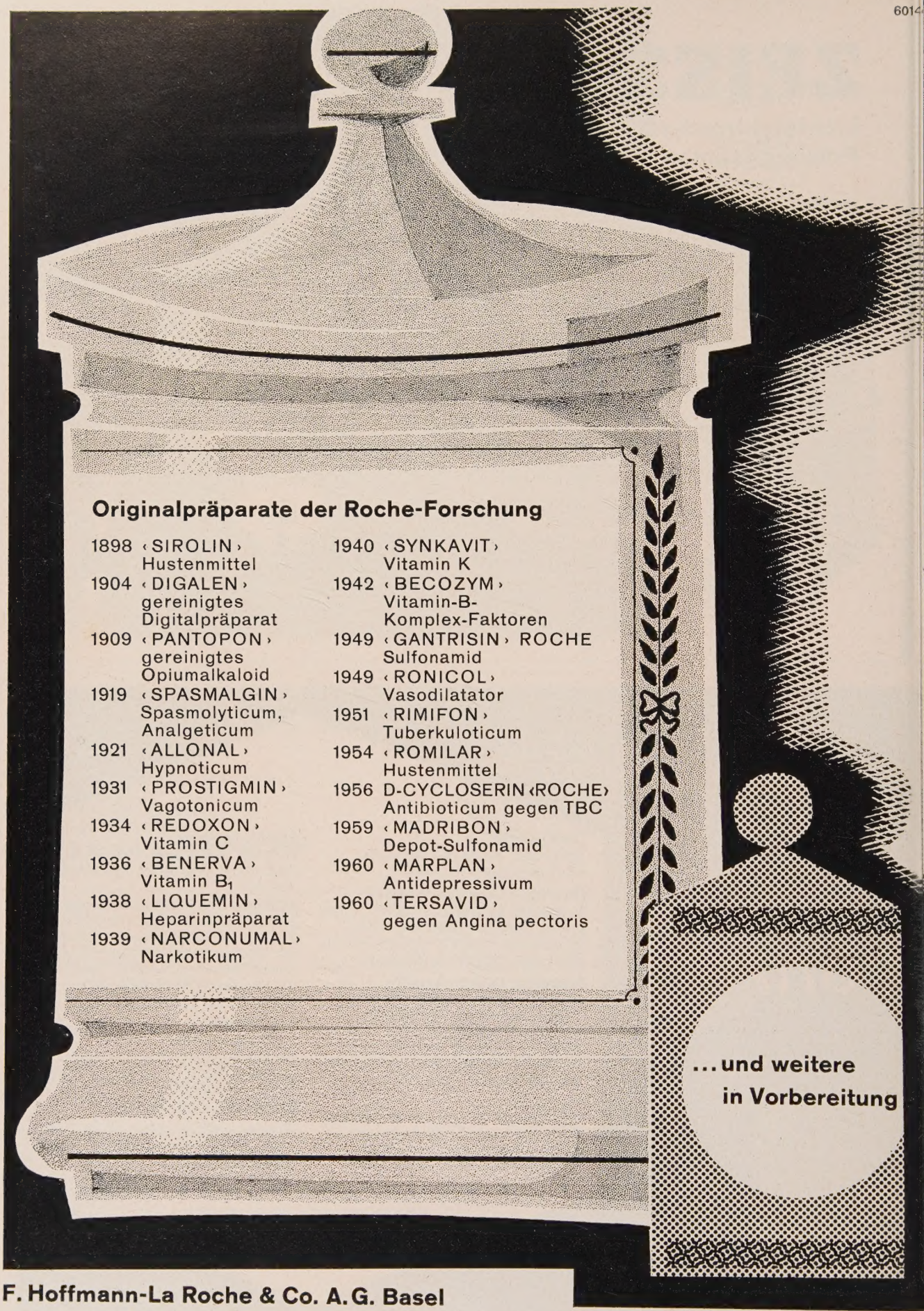
Siliciummetall (Reinsilicium)

Siliciumcarbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie Lonsicar® als Betonhartstoff

Graphit min. 99,9 % C

LONZA ELEKTRIZITÄTSWERKE + CHEMISCHE FABRIKEN
AKTIENGESELLSCHAFT BASEL

*



Originalpräparate der Roche-Forschung

1898 ‹SIROLIN› Hustenmittel
1904 ‹DIGALEN› gereinigtes Digitalpräparat
1909 ‹PANTOPON› gereinigtes Opiumalkaloid
1919 ‹SPASMALGIN› Spasmolyticum, Analgeticum
1921 ‹ALLONAL› Hypnoticum
1931 ‹PROSTIGMIN› Vagotonicum
1934 ‹REDOXON› Vitamin C
1936 ‹BENERVA› Vitamin B_1
1938 ‹LIQUEMIN› Heparinpräparat
1939 ‹NARCONUMAL› Narkotikum
1940 ‹SYNKAVIT› Vitamin K
1942 ‹BECOZYM› Vitamin-B-Komplex-Faktoren
1949 ‹GANTRISIN› ROCHE Sulfonamid
1949 ‹RONICOL› Vasodilatator
1951 ‹RIMIFON› Tuberkuloticum
1954 ‹ROMILAR› Hustenmittel
1956 D-CYCLOSERIN ‹ROCHE› Antibioticum gegen TBC
1959 ‹MADRIBON› Depot-Sulfonamid
1960 ‹MARPLAN› Antidepressivum
1960 ‹TERSAVID› gegen Angina pectoris

...und weitere in Vorbereitung

F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. Basel

EXPERIENTIA

Vol. XVI – Fasc. 8 Pag. 337–384 15. VIII. 1960

La dynamique des courants marins

Par B. SAINT-GUILY*

Introduction

La dynamique des courants marins étudie les mouvements qui se produisent dans les Océans. Cette science, qui est en quelque sorte fille de l'hydrodynamique et de l'océanographie, se heurte à deux genres de difficultés. Les premières tiennent à la complexité des conditions naturelles: rotation de la Terre, géométrie du fond et des côtes, etc. Les secondes proviennent du manque d'observations précises; les mesures en mer sont en effet difficiles et coûteuses.

La complexité des conditions naturelles conduit, dans les essais d'interprétation théorique, à des problèmes mathématiques en général difficiles. Et, quand il s'agit de problèmes concrets, on doit souvent utiliser des modèles réduits ou des machines à calculer électroniques. L'intérêt des modèles mathématiques suffisamment simples pour donner une solution complète et maniable reste bien entendu entier. Ces modèles mettent en évidence l'importance relative (suivant les valeurs des divers paramètres) des forces agissantes, et permettent ainsi de comprendre de façon globale et quantitative les traits essentiels et l'organisation intime des phénomènes.

Les courants marins peuvent être assez rapides en surface, dans certaines régions comme dans le Gulf Stream, le Kuroshio, le courant des Aiguilles, etc., et près des côtes, par fonds faibles, si les marées sont importantes. Ils ont alors des vitesses de l'ordre de 1 à 2 m/s. Mais en dehors de ces zones de courants rapides, et en profondeur, les courants sont plus lents; ils ont des vitesses de l'ordre de 10 à 20 cm/s.

Il existe cependant des courants intenses en profondeur: le Gulf Stream, par exemple, atteint une profondeur de 500 m. Et on a découvert récemment qu'il existait à l'Equateur, dans l'Océan Pacifique, à une profondeur de l'ordre de 100 m, un courant de 1 m/s portant à l'Est[1]. L'origine de ce courant n'est pas encore expliquée et c'est un des problèmes sur lesquels portent maintenant les recherches.

L'exposé qui suit est une courte introduction à la dynamique des courants marins; il tente en quelques paragraphes essentiels de suivre le chemin naturel qui, à travers les débuts de cette science, conduit aux problèmes actuels.

Accélération et force de Coriolis

Cette accélération joue un rôle dominant dans tous les problèmes de la dynamique des océans. Il est donc nécessaire d'en rappeler l'origine.

Dans l'étude du mouvement d'un point sur un corps lui-même en mouvement par rapport à un repère fixe dit absolu, on distingue trois mouvements; un mouvement absolu qui est le mouvement du point par rapport au repère fixe, un mouvement relatif qui est celui du point par rapport au corps mobile, et un mouvement d'entraînement qui est le mouvement du corps mobile par rapport au repère fixe. La composition de ces mouvements conduit pour les vitesses à un résultat intuitif; si V_a, V_r, V_e, désignent les vitesses absolue, relative et d'entraînement, on a:

$$V_a = V_e + V_r.$$

Par contre, pour les accélérations, le théorème de CORIOLIS[2] montre que l'on a:

$$J_a = J_e + J_r + J_c;$$

où J_a, J_r, J_e, J_c désignent respectivement les accélérations absolue, relative, d'entraînement et complémentaire. Dans le mouvement relatif on a ainsi une accélération apparente qui n'est pas J_r mais:

$$J_a - J_e = J_r + J_c.$$

L'accélération complémentaire de CORIOLIS est proportionnelle à la vitesse angulaire de rotation du corps mobile par rapport au repère fixe, à la vitesse relative

* Laboratoire d'Océanographie Physique, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris.

[1] T. CROMWELL, R. B. MONTGOMERY et E. D. STROUP, Science *119*, 648 (1954).

[2] G. G. CORIOLIS, J. Ecole R. polytechn. *15*, 142 (1835).

et au sinus de l'angle compris entre la direction de cette vitesse relative et celle de l'axe instantané de rotation. La direction de cette accélération est normale au plan défini par l'axe instantané de rotation et la vitesse relative, et telle que le trièdre axe-vitesse-accélération de CORIOLIS soit direct.

En appliquant ce résultat général aux courants horizontaux existant sur le globe terrestre, on voit que l'accélération de CORIOLIS est ici proportionnelle à la vitesse de ces courants, à la vitesse angulaire de rotation de la Terre ω, et au sinus de la latitude φ:

$$J_c = 2\,\omega \sin\varphi\, V_r;$$

cette accélération est donc nulle à l'équateur et maxima aux pôles; elle est normale à la vitesse relative, sur sa droite dans l'hémisphère Nord, sur sa gauche dans l'hémisphère Sud (voir Fig. 1). Elle porte le nom de CORIOLIS bien qu'elle ait été trouvé antérieurement par LAPLACE[3].

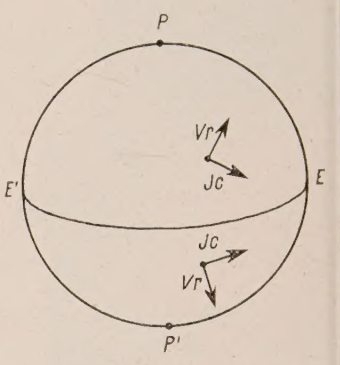


Fig. 1. Accélération de CORIOLIS à la surface du globe. $P\,P'$ pôles, EE' équateur, V_r vitesse relative, J_c accélération de CORIOLIS correspondante.

Courant géostrophique

Une relation théorique établie par BJERKNES[4] a été appliquée par SANDSTRÖM et HELLAND-HANSEN[5] aux courants marins. Elle repose sur les hypothèses suivantes: le mouvement est permanent, lent et sans frottement; elle exprime l'équilibre entre l'accélération de CORIOLIS et celle provenant du gradient de pression par suite des hétérogénéités de densité. Lorsque, par la mesure précise de la température et de la salinité, on connaît le champ de densité, cette relation permet d'en déduire, à une constante près, la vitesse aux diverses profondeurs. Le courant ainsi calculé se nomme géostrophique ($\gamma\eta$ terre, $\sigma\tau\rho o\varphi\varepsilon\omega$ je tourne).

Prenons un axe OZ vertical, un axe OX horizontal tel que le plan OX, OZ soit normal aux surfaces isopycnes (d'égale densité); la vitesse du courant géostrophique est normale au plan OX, OZ.

Désignons par ϱ la densité, g la pesanteur, V_n la vitesse à la profondeur z_n, $\delta\varrho_n$ la différence de densité entre deux points distants de δx à cette profondeur (voir Fig. 2); dans ces conditions la formule de HELLAND-HANSEN s'écrit:

$$V_{n+1} - V_n = \frac{g(\delta\varrho_{n+1} - \delta\varrho_n)}{2\,\omega \sin\varphi\, \delta x}.$$

Elle montre bien que la vitesse n'est donnée qu'à une constante près. Il faut donc adopter une profondeur de vitesse nulle; on la choisit en général assez grande (de l'ordre de 1000 m ou plus) de sorte que les surfaces isopycnes y soient sensiblement horizontales.

Ce choix de la profondeur de vitesse nulle est un problème difficile qui n'a pas reçu encore de solution satisfaisante. Si cette profondeur est bien choisie, le courant géostrophique semble représenter convenablement le courant moyen réel. La Figure 3 montre une comparaison entre des valeurs observées et calculées pour le seul cas où des mesures directes de la vitesse ont été effectuées; l'accord est excellent.

La formule de HELLAND-HANSEN ne convient pourtant plus près de l'équateur, ni près du fond, ni en surface si le vent souffle, ni lorsque le courant varie assez rapidement. De plus elle ne donne aucune explication sur la cause des courants marins. Elle relie seulement l'inclinaison des surfaces isopycnes au courant sans dire comment cette inclinaison est due aux actions mécaniques (vent) et thermiques imposées aux océans.

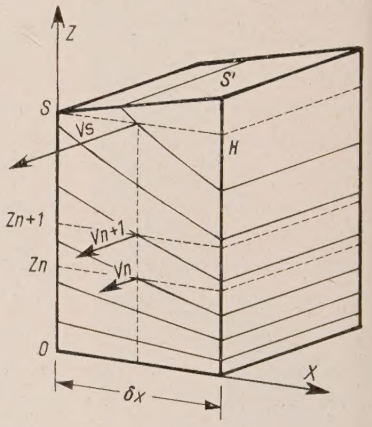


Fig. 2. Courant géostrophique. Les courbes en traits fins repésentent les surfaces d'égale densité (isopycnes), SS' la surface, OX la profondeur de vitesse nulle, V_s, V_{n+1}, V_n les vitesses en surface et aux profondeurs Z_{n+1}, Z_n.

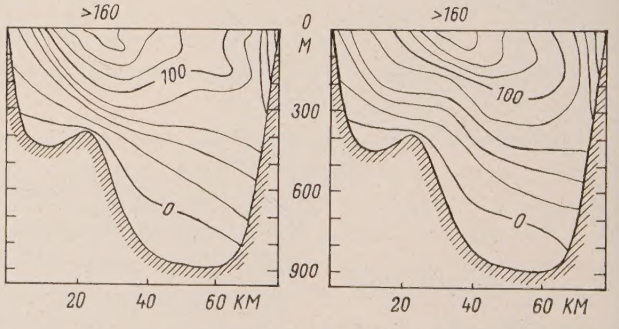


Fig. 3. A gauche courant observé, à droite courant géostrophique calculé dans le détroit de Floride (d'après G. WUST, 1924). Sur ces coupes verticales sont portées les lignes d'égale vitesse en multiples de 20 cm/s, les profondeurs en m et les distances horizontales en km.

[3] P. S. LAPLACE, Mem. Acad. R. Sci., Paris (1775).

[4] V. BJERKNES, Kgl. Svenska Vet. Akad., Stockholm *31*, 4, 35 (1898).

[5] J. W. SANDSTROM et B. HELLAND-HANSEN, Rep. Norw. Fish. Mar. Invest., Oslo *2*, 4 (1903).

Courant de vent et théorie d'Ekman

L'action directe du vent sur la surface de la mer est physiquement très complexe; elle peut être représentée par une tension appliquée en surface et transmise à l'intérieur des océans par turbulence. On doit à EKMAN[6] la première étude théorique convenable sur le courant de vent ainsi produit. EKMAN suppose l'eau homogène (densité constante), le mouvement permanent, et il admet que l'accélération de CORIOLIS est équilibrée par celle des frottements. Ceux-ci sont représentés à l'aide d'une viscosité «virtuelle» dont le coefficient ou facteur de turbulence (supposé constant) est bien supérieur à celui de la viscosité proprement dite. Cette représentation schématique de la turbulence avait été introduite par BOUSSINESQ[7]. Avec ces hypothèses, le calcul du courant produit par un vent de direction et de vitesse constantes conduit à des résultats remarquables. La direction du courant se trouve en surface à 45° sur la droite de la direction vers laquelle souffle le vent dans l'hémisphère Nord (sur la gauche dans l'hémisphère Sud); à mesure que la profondeur augmente, cette direction tourne dans le sens indirect (sens des aiguilles d'une montre) dans l'hémisphère Nord. Quant à l'intensité du courant, elle décroît exponentiellement avec la profondeur. Le courant de vent direct n'intéresse qu'une faible couche d'eau au-dessous de la surface (de l'ordre de 70 m pour un facteur de turbulence égal à 300 $g \cdot cm^{-1}/s^{-1}$) sauf au voisinage immédiat de l'équateur où l'action directe du vent se fait sentir en profondeur.

Cette théorie de EKMAN a été généralisée dans plusieurs directions par divers auteurs. En particulier le facteur de turbulence n'est pas constant, il dépend de façon complexe de la vitesse et de la densité; d'une manière générale il décroît avec la profondeur (Fig.4). Mais nous n'en savons guère plus car nous ignorons comment se font les échanges turbulents dans les océans et comment l'énergie apportée par le vent s'y trouve dissipée. Le progrès dans ce domaine est lié à celui de notre connaissance de la structure fine des courants (dans l'espace et dans le temps).

EKMAN[8] lui-même a montré que la variation avec la latitude du paramètre de CORIOLIS ($2\omega \sin\varphi$) et celle de la profondeur introduisent respectivement un tourbillon (rotationnel) «planétaire» et un tourbillon «topographique» dans l'équation des tourbillons. Autrement dit, le tourbillon T_g de la circulation générale est la somme de trois termes, un terme T_v provenant de l'action tourbillonnaire du vent, un terme T_c provenant de la variation du paramètre de CORIOLIS avec la

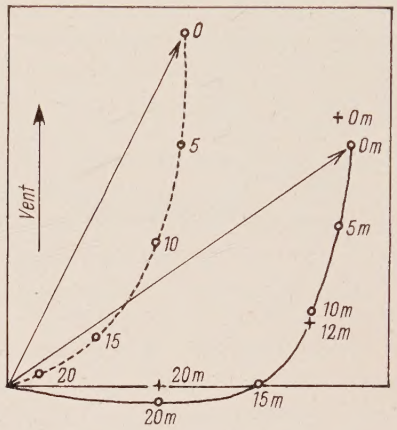


Fig. 4. Courant de vent pour une faible profondeur (d'après J. E. FJELDSTAD, 1929). En tireté, courant calculé en supposant le facteur de turbulence constant; en trait plein, courant calculé en supposant que ce facteur décroît en profondeur; les croix représentent les valeurs observées, les chiffres les profondeurs en m.

[6] V. W. EKMAN, Ark. Mat. Astr. Fys., Stockholm *2*, 11 (1905).
[7] V. J. BOUSSINESQ, Mem. présenté par div. savants, Paris *23* (1877).
[8] V. W. EKMAN, Ark. Mat. Astr. fys., Stockholm *17*, 26 (1923).

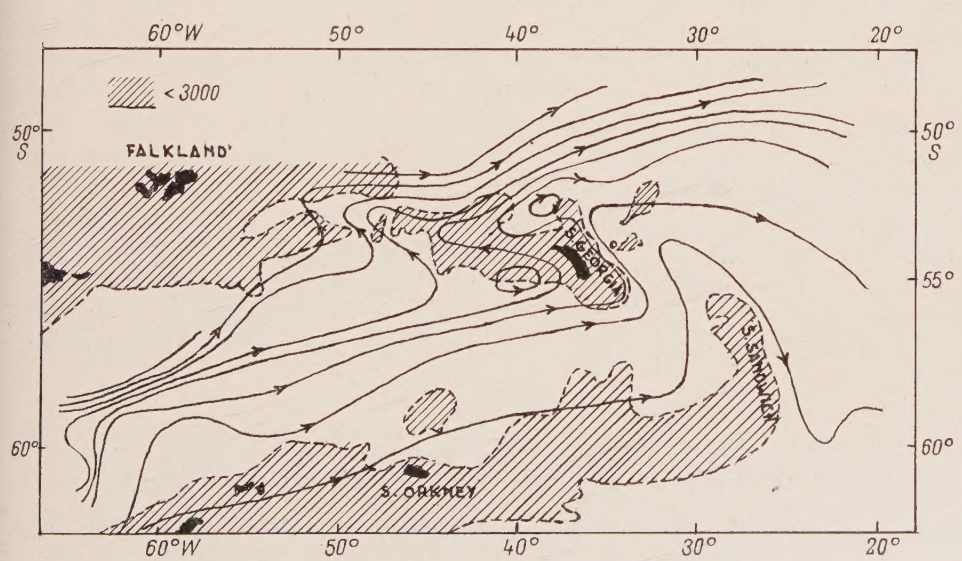


Fig. 5. Effet du relief du fond sur les lignes de courant (géostrophique) dans la région comprise entre le passage de Drake et l'Est des îles Sandwich du Sud (d'après H. U. SVERDRUP 1942).

latitude, et un terme T_h provenant des variations de la profondeur. On a ainsi:

$$T_g = T_v + T_c + T_h;$$

l'action du terme T_h est fort complexe puisqu'elle dépend du relief réel du fond. Qualitativement on a dans l'hémisphère Nord le résultat suivant: si le courant se dirige vers les profondeurs croissantes, il est dévié vers la gauche, s'il se dirige vers les profondeurs décroissantes, il est dévié vers la droite (Fig. 5); l'effet est inverse dans l'hémisphère Sud et il est nul à l'équateur. STOMMEL[9] a montré que l'action du terme T_c se traduisait par une intensification des courants dans la partie Ouest des océans. Cette particularité est remarquablement illustrée par l'existence de grands courants tels que le Gulf Stream et le Kuroshio (Fig. 6).

Une autre généralisation de la théorie de EKMAN est celle qui tient compte de la composante verticale de la vitesse[10, 11]. Dans ces conditions le calcul du courant induit par le vent dans une mer fermée montre comment le vent produit une inclinaison de la surface libre et des surfaces isopycnes (s'il existe un champ de densité). L'existence du fond et des frontières latérales, c'est-à-dire le fait que la mer est fermée, ajoute à l'action directe du vent une action indirecte par la création d'un courant de pente (ou d'un courant géostrophique). Il est alors clair, si l'on tient compte des valeurs numériques en jeu, que le vent est la cause principale des courants marins.

Mouvements verticaux et circulation profonde

Au point de vue thermique, les océans se comportent comme des échangeurs de chaleur qui véhiculent des calories de l'Equateur vers les Pôles. Le vent est la cause essentielle de ces mouvements horizontaux de convection; mais les différences de température, donc de densité, dues aux réchauffements et refroidissements en surface, produisent aussi des courants dans les océans. Ces courants, bien que faibles, jouent un rôle important dans les mouvements verticaux ascendants ou descendants et dans la circulation profonde qui en résulte.

L'étude théorique de ces problèmes est ardue. Si l'on considère simplement un mouvement moyen à grande échelle, il est nécessaire de faire intervenir dans l'équation décrivant les échanges thermiques une diffusion apparente due à la turbulence. L'équation des échanges exprime qu'il y a équilibre entre l'action de la convection et celle de la diffusion turbulente; mais son traitement mathématique est difficile car les termes convectifs ne sont pas linéaires.

Dans un important travail, CHANDRASEKHAR[12] a montré que l'accélération de CORIOLIS s'oppose à la convection verticale. Cette accélération a donc un effet stabilisateur en favorisant l'existence des courants horizontaux et celle des stratifications de densité parfois importantes (thermoclines). Les courants verticaux ont ainsi des vitesses moyennes très faibles (inférieures à 1 m/jour) qui sont plus petites ou du même ordre que les vitesses turbulentes.

Malgré plusieurs essais récents, on ne sait pas actuellement décrire de façon claire et globale la circulation thermo-convective dans les océans. Cependant si on admet qu'il existe à une certaine profondeur des mouvements verticaux donnés, on peut en déduire la circulation profonde induite. Le problème prend en effet une forme simple; il s'agit de trouver les courants produits par un ensemble de «sources» et de «puits». Là encore la variation du paramètre de CORIOLIS avec la latitude doit intervenir en déplaçant les zones de courants relativement intenses vers l'Ouest des océans.

Structure fine des courants

Tout ce qui précède ne concerne que l'aspect moyen et à grande échelle de la circulation océanique. Récemment, l'emploi de plusieurs navires océanographiques travaillant ensemble, de courantomètres électromagnétiques, et de thermomètres sensibles au rayonnement infra-rouge montés sur avion, a montré la complexité de la structure fine et instantanée du Gulf Stream. On s'est aperçu que ce courant était composé de plusieurs veines fluctuantes formant des méandres et des tourbillons mobiles (Fig. 7). Le mécanisme de ces phénomènes transitoires n'est pas encore clair; cependant l'inertie, la variable temps et la variation du paramètre de CORIOLIS avec la latitude, y jouent certainement les premiers rôles.

D'une manière générale, tous les mouvements dans les océans sont transitoires et lorsqu'on regarde les choses un peu en détail, leur caractère permanent disparaît et laisse place à une certaine turbulence. Il y a bien entendu dans cette turbulence des phénomènes périodiques. Il y a des courants de marée importants près des côtes mais beaucoup plus faibles au large. Certains courants suivent de toute évidence le régime des vents: le courant de Somalie par exemple, change de sens avec la mousson. Par contre, le débit du Gulf Stream présente une fluctuation de période annuelle et de 15 millions de m^3/s d'amplitude, dont l'origine et le mécanisme ne sont pas expliqués[13].

Le problème de la réponse des courants marins aux changements du vent a été l'objet d'études théoriques récentes. Ces études ont montré que l'hétérogénéité des eaux modifiait le phénomène de façon essentielle. Dans les régions océaniques situées sous les latitudes

[9] H. STOMMEL, Trans. Amer. geophys. Union *29*, 202 (1948).
[10] P. VELANDER, Tellus, Stockholm *9*, 1 (1957).
[11] B. SAINT-GUILY, Dtsch. hydr. Z., Hamburg (à paraître en 1960).
[12] S. CHANDRASEKHAR, Proc. R. Soc., London [A] *208*, *1953*.
[13] C. O'D. ISELIN, Pap. Phys. Ocean. Meteor. *8*, 1 (1940).

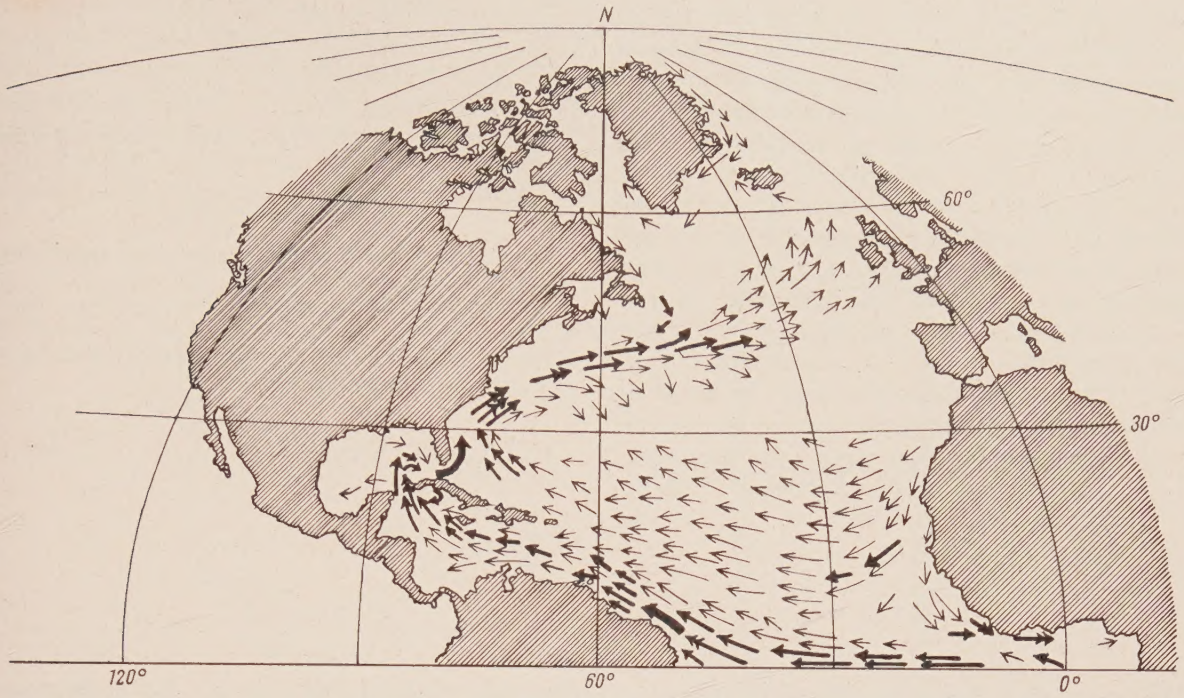


Fig. 6. Courants de surface dans l'Océan Atlantique en hiver (hémisphère Nord) d'après G. SCHOTT 1943.

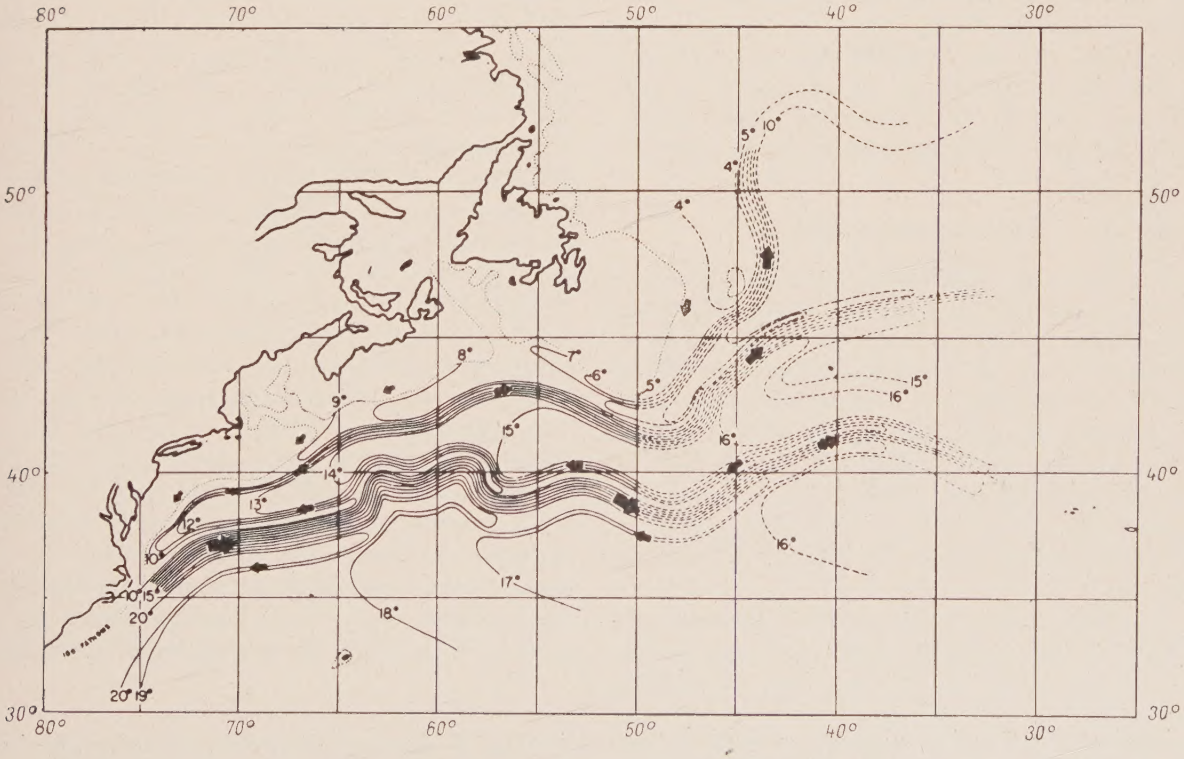


Fig. 7. Carte des températures en °C et des courants correspondants à la profondeur de 200 m dans la région du Gulf Stream (d'après F. C. FUGLISTER, 1951).

moyennes ou basses, il existe en surface une couche d'eau légère relativement mince (300 m d'épaisseur environ) surmontant une couche d'eau plus lourde qui s'étend jusqu'au fond. Si l'on schématise les choses en considérant un océan constitué par deux couches d'eau superposées de densités distinctes, on trouve que la réponse de l'océan à l'action du vent se fait suivant une combinaison de deux modes différents[14]. Dans le premier mode, dit «barotrope», l'océan répond aux changements de vent comme s'il était homogène; la frontière séparant les deux couches d'eau est à peine perturbée. Dans le second mode, dit «barocline», le mouvement de la frontière limite des deux couches d'eau est important (on a des ondes internes) et les courants dans la couche inférieure ont une vitesse très faible. L'importance relative des deux modes de réponse varie suivant la manière dont change le vent. Ces résultats nous aident à comprendre l'action des vents variables sur les océans, mais il n'est pas encore possible de dire dans quelle mesure ils représentent convenablement la réalité.

Zusammenfassung

Die CORIOLIS-Beschleunigung spielt eine entscheidende Rolle in der Dynamik der Meeresströmungen. Sie wirkt sich durch eine Ablenkung der Strömungen und durch ein Verlangsamen der Vertikalbewegungen aus. Durch diese doppelte Aktion wird die Untersuchung der Konvektions- und Übergangsströmungen erschwert.

[14] G. VERONIS et H. STOMMEL, J. marin. Res. *15*, 1 (1956).

Die von den Leuchtzifferblättern herrührende Strahlendosis in der Schweiz

Von G. JOYET und M. MILLER*

Da uns die im Jahre 1957 ausgeführten ersten Messungen und Schätzungen[1] gezeigt haben, dass die von den radioaktiven Leuchtzifferblättern stammende Gonadendosis nicht zu vernachlässigen ist und in der Grössenordnung gleich derjenigen des aktiven Niederschlags sein könnte, haben wir unsere Untersuchung weitergeführt und sie vervollständigt und präzisiert. Das Ziel der Untersuchung ist abzuklären, welche Richtlinien man für die Verwendung von Radioelementen zur Aktivierung der Leuchtmassen aufstellen soll.

Untersuchungsmethode

1. An Hand von Fragebogen, welche an repräsentative Teile der Bevölkerung verteilt wurden, haben wir die Häufigkeit der Männer und Frauen, die eine Armbanduhr mit Leuchtzifferblatt tragen, ermittelt. Gleichzeitig wurde das Alter, ab welchem die radioaktive Uhr getragen wurde, und die tägliche Dauer des Tragens (Tragen der Uhr während der Nacht oder nicht) bestimmt. Es wurde ferner gefragt, wer auf seinem Nachttisch einen Wecker mit Leuchtziffern hat. Ausserdem wurde die Marke der Uhr und des Weckers festgestellt.

2. Im Laboratorium wurde die Radioaktivität einiger Hundert Armbanduhren und Wecker aus der Bevölkerung gemessen. Die Messung der γ-Strahlung wurde mit einem mit Diskriminator versehenen Impulsverstärker mit kollimatiertem NaJ(Tl)-Kristall ausgeführt. Die Abbildung 1 zeigt die Anordnung des abgeschirmten Kristalls (Abschirmung 5,0 cm Blei und 2,5 cm Quecksilber). Die γ-Strahlung ist mit dem üblichen Filter von 0,5 mm Platin filtriert. Die Messung der β-Strahlung wurde in einer bestimmten Geometrie [Fenster 25 mm Durchmesser, 2,0 mg/cm^2 Glimmer, Abstand Fenster bis Zifferblattebene 60 mm (Abb. 2)] und mit verschiedenen Aluminium-Absorbern mit G.-M.-Zähler vorgenommen. Die kombinierten γ- und β-Messungen ermöglichen – ohne dass die Uhr (bzw. der Wecker) geöffnet wird – zu beurteilen, ob das Zifferblatt mit reinem Radium oder mit einem reinen β-Strahler (z. B. ^{90}Sr) oder mit einer Mischung der beiden geladen ist. Die Abbildung 3 zeigt die Absorptionskurven von 4 mit Radium aktivierten Uhren, die Absorptionskurve von ^{90}Sr + ^{90}Y (Vorfiltrierung 1,2 mm Plexiglas), ferner von einer Uhr (WTC), die mit einer Mischung von Radium und wahrscheinlich ^{90}Sr + ^{90}Y aktiviert ist, und endlich von einer Uhr (Mir.), bei welcher die grosse β-Aktivität hauptsächlich auf Strontium zurückzuführen ist. Man beachte, dass die in der erwähnten Geometrie gemessene relative β-Aktivität pro Mikrocurie Radiumäquivalent (β/μC Ra) für Radium innerhalb bestimmter Grenzen bleibt. Sobald aber das Radium von einer nennenswerten Menge ^{90}Sr + ^{90}Y begleitet wird, steigt die β-Aktivität/μC Ra deutlich an. Das Vorhandensein von Radium und seinen Zerfallsprodukten wird durch die Messung der γ-Strahlung mit

* Betatron- und Isotopenlaboratorium im Universitätsröntgeninstitut Zürich.

[1] G. JOYET, in *Symposium über schädliche Wirkungen schwacher Strahlendosen* (Benno Schwabe, Basel 1958), p. 348.

dem Szintillationskristall in zwei Stellungen 0 und 35 der Schwellen des Diskriminators festgestellt. Diese zwei Messungen stehen für reines Radium in einem konstanten Verhältnis, $\gamma = 0{,}27 \pm 0{,}02$. Dieses Verhältnis γ beträgt 0,06 für die Bremsstrahlung des Strontiums, 0,50 für ^{60}Co und 0,26 für ^{137}Cs. In zweifelhaften Fällen wird eine weitere Messung mit Stellung 50

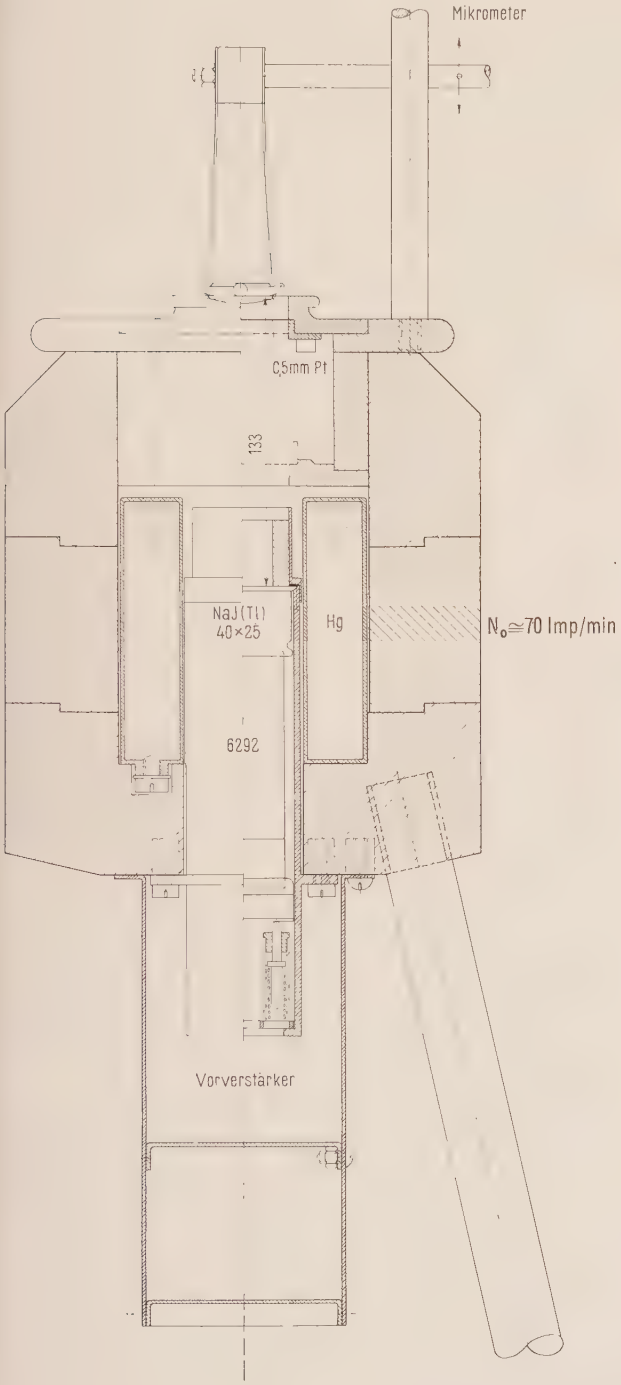


Abb. 1. Anordnung der γ-Messung des Leuchtzifferblatts mit Szintillationskristall. Abschirmung 5 cm Pb und 2,5 cm Hg. Platinfilter 0,5 mm. Abstand Kristall-Zifferblattebene 133 mm mit Mikrometerschraube eingestellt.

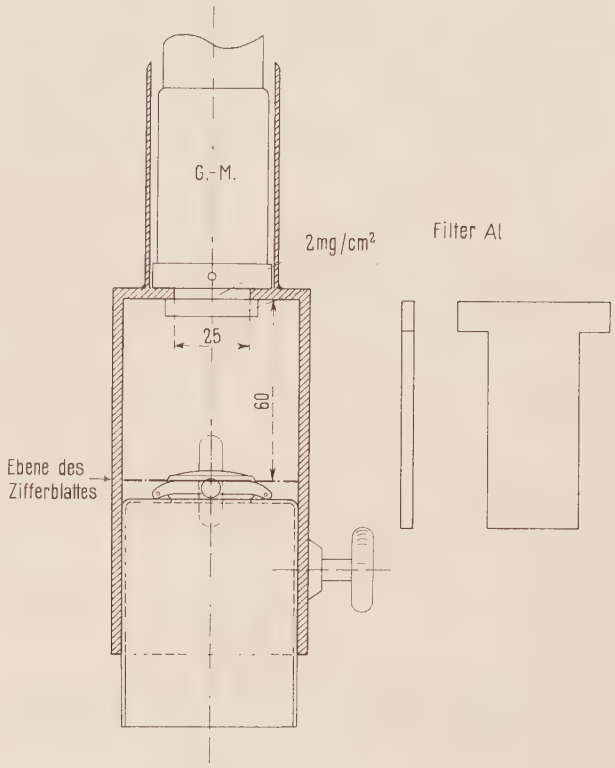


Abb. 2. Geometrie der β-Absorption

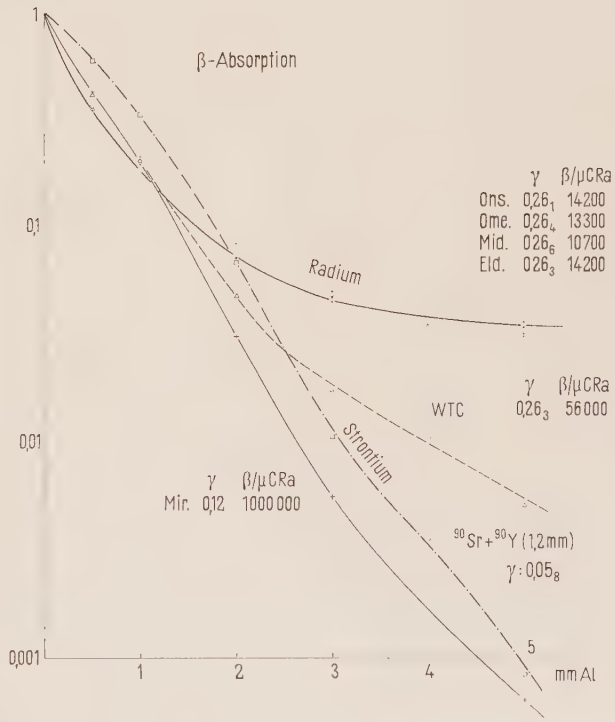


Abb. 3. Absorptionskurven in Aluminium der β-Strahlung von Uhrenzifferblättern, die mit verschiedenen Radioelementen (Ra, ^{90}Sr+^{90}Y oder einer Mischung der beiden) aktiviert sind. Die Geometrie der Absorption ist in Abbildung 2 angegeben.

des Diskriminators durchgeführt. Die Abbildung 4 gibt für verschiedene Radioelemente (Ra und Zerfallsprodukte, ^{60}Co, ^{137}Cs, ^{90}Sr + ^{90}Y) das Verhältnis $\gamma = N_x/N_0$, für verschiedene Stellungen D_x der Schwelle des Diskriminators.

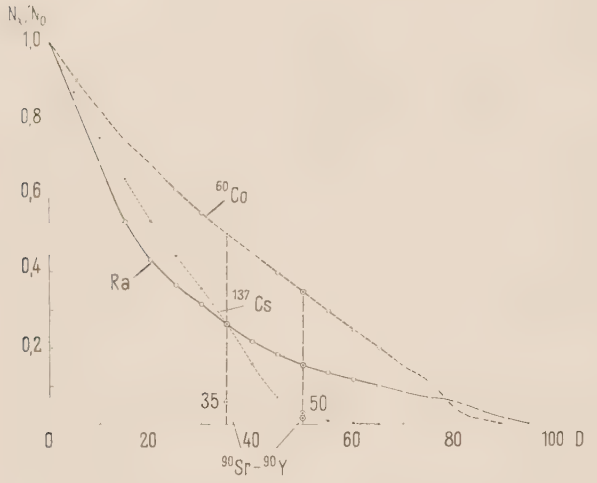


Abb. 4. Verhältnis N_x/N_0 der mit Szintillationszähler gemessenen γ-Aktivitäten in Abhängigkeit der Lage D der Schwelle des Diskriminators. Kurven für Ra, ^{60}Co, ^{90}Sr+^{90}Y und ^{137}Cs. Die Uhren sind in den Stellungen $D = 35$ und 50 gemessen worden.

3. Das Verhältnis zwischen der am Handgelenk getragenen Radiumladung und der erhaltenen Gonadendosis wurde bei 24 freiwilligen Versuchspersonen verschiedener Berufe gemessen. Jede dieser Personen trug während 3 Tagen am linken Handgelenk eine auf einem Plexiglasklotz angebrachte Radiumquelle von 100 μC[1]. Auf der linken Schulter (Augendosis) und auf der Höhe der Ovarien oder der Testikeln (Gonadendosis) wurde je ein Paar kleine Ionisationskammern mit Bandagen angebracht. Mittels dieser Ionisationskammern wurde jeweils die Tagesdosis und die Nachtdosis gemessen. Für die Berechnung der Ovariendosis nahmen wir an, dass die Ovarien in einer Tiefe von 8 cm liegen, was einem Übertragungsfaktor (Einfluss der Absorption und des Abstandes) von 50% entspricht.

Aus diesen Messungen ergeben sich für mit Radium aktivierte Uhren, die fortwährend getragen werden, die folgenden jährlichen und mittleren Gonadendosen:
Mann $D_1^m = 70$ mr $\pm$ 12% jährliche γ-Strahlen-Dosis
Frau $D_1^w = 65$ mr $\pm$ 15% für 1 μC Ra.

Die linke Schulter, die bei den üblichen Bewegungen der linken Hand etwa den gleichen Abstand vom Handgelenk hat wie die Augen, erhält eine γ-Strahlendosis, die im Mittel für den Mann das 2,0fache und für die Frau das 2,6fache der Gonadendosis beträgt (β-Strahlendosis nicht inbegriffen).

Erste Ergebnisse

Mit der beschriebenen Methode ergaben sich bis jetzt die folgenden Resultate:

a) Von den 948 ausgesuchten und befragten Personen von Stadt und Land tragen 65 $\pm$ 4% der Männer und 21 $\pm$ 6% der Frauen eine Uhr mit Leuchtzifferblatt.

b) Die Hälfte dieser Uhren wird von den Männern schon seit dem 18. Altersjahr und von den Frauen seit dem 17. Altersjahr getragen.

c) Von den 249 *getragenen* Uhren, deren Strahlung untersucht und gemessen wurde, sind 93,6% mit praktisch reinem Radium aktiviert. 1,6% (4 Uhren) sind mit einer Mischung von Radium und ^{90}Sr oder anderen unbekannten Radioisotopen, und 2,0% (5 Uhren) sind mit praktisch reinem Strontium aktiviert.

Die Untersuchung der Strahlung blieb bei 7 getragenen Uhren (2,8%) unsicher.

Von den 75 *neuen* Uhren (direkt aus dem Laden bezogen), deren Strahlung untersucht und gemessen wurde, sind nur 81,3% mit praktisch reinem Radium aktiviert. 13,4% (10 Uhren) sind mit einer Mischung von Radium und Strontium, und 5,3% (4 Uhren) sind mit praktisch reinem Strontium aktiviert.

d) Die durchschnittliche Aktivität der mit Radium aktivierten Uhren ist in der folgenden Tabelle angegeben:

	Herrenuhren		Damenuhren	
	Anzahl	μC Ra Mittelwert	Anzahl	μC Ra Mittelwert
Getragene Uhren	199	$0{,}12_5$	34	$0{,}05_9$
Neue Uhren	46	$0{,}22_3$	15	$0{,}07_5$
Zusammen	245	$0{,}14_4$	49	$0{,}06_4$

Es ist zu bemerken, dass die bekanntesten Marken wie Omega, Longines, Eterna, Tissot, Zenith usw. in unserer Statistik nicht als die häufigsten getragenen Uhren erscheinen. Die am meisten getragenen Uhren gehören einer grossen Anzahl von fast unbekannten Marken an. Dieser Verteilung nach der Uhrenmarke wurde in der obigen Tabelle noch nicht Rechnung getragen. Ferner gibt es Sportuhren (Uhren für Schwimmer), deren Aktivität sehr hoch ist und 0,6–4,5 μC Ra erreichen kann. Nach den Werten von D_1, die in Abs. 3 angegeben sind, haben solche Uhren, wenn sie fortwährend getragen werden, für das Individuum eine Gonadendosis zur Folge, die ein Vielfaches der natürlichen Strahlung erreichen kann. Von diesen Uhren ist nur eine neue von 2 μC in der Statistik der obigen Tabelle mitgerechnet worden.

e) Etwa 68,0 $\pm$ 5% der Herren und 67,5 $\pm$ 5% der Damen haben auf ihrem Nachttisch einen *Wecker mit Leuchtzifferblatt*.

f) Trotz der auffallend grossen Menge Leuchtmasse, die auf dem Zifferblatt der Wecker angebracht wird, ist die Radioaktivität im Mittel eher kleiner als diejenige einer Uhr. Es wurde von insgesamt 81 Weckern die Strahlung untersucht und gemessen. Die Messungen der mit Radium aktivierten Wecker (65) ergaben eine

mittlere Aktivität von $0{,}07_9\,\mu$C Ra. 12 von den gemessenen Weckern, also 15%, sind mit einer Mischung von Strontium und Radium, und 4 Wecker, also 5%, sind mit praktisch reinem Strontium aktiviert.

Aus diesen Werten ergibt sich für die Wecker eine Gonadendosis, die schätzungsweise nur etwa einen Zehntel der Gonadendosis der Leuchtzifferblätter der Armbanduhren beträgt.

Berechnung der genetischen Dosis

Die pro Generation erhaltene *genetische Dosis* ist gleich der Summe der Strahlendosen, welche die beiden Gameten oder ihre Vorfahren bis zum Moment der Befruchtung während des Lebens der Eltern erhalten haben. Diese Definition entspricht der Definition der «Recommendations of the International Commission on Radiological Protection»[2]. Die genetische Dosis ist also gleich der Summe von zwei Komponenten, nämlich einer männlichen und einer weiblichen.

Wir verwenden hier die folgenden Zeichen, w für Frau (woman), m für Mann (man), W für Uhr (watch), y für das Alter in Jahren (year), und bezeichnen in der Berechnung:

W_y^w = Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine Frau im Altersjahr y ein Leuchtzifferblatt trägt.

W_y^m = Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Mann im Altersjahr y ein Leuchtzifferblatt trägt.

A^w und A^m = Mittlere Aktivität in μC Ra von Herren- bzw. Damenuhren.

D_1^w und D_1^m = Jährliche weibliche und männliche Gonadendosen für 1 μC-Aktivität des Leuchtzifferblattes.

P_y^w = Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine Frau im Altersjahr y eine Tochter gebiert.

ω = höchstes, gebärfähiges Alter.

Da die entsprechende Wahrscheinlichkeit für den Mann in der Bevölkerungsstatistik nicht ermittelt ist, nehmen wir an,

$P_y^m = P_{y-4}^w$ = Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Mann im Altersjahr y eine Tochter bekommt.

Es wird also angenommen, dass das Alter des Vaters systematisch vier Jahre höher liegt als das Alter der Mutter. Aus diesen Definitionen und nach einer kurzen Berechnung ergibt sich für die genetische Dosis die Formel:

$$\frac{A^w D_1^w \int_0^\omega \int_0^y W_y^w\,dy\,P_y^w\,dy + A^m D_1^m \int_0^\omega \int_0^y W_y^m\,dy\,P_{y-4}^w\,dy}{\int_0^\omega P_y^w\,dy}$$

Auf Grund unserer Statistik gibt die Abbildung 5 die Kurven W_y^w und W_y^m für die Verteilung der Armbanduhren mit Leuchtzifferblättern in der Bevölkerung in Abhängigkeit vom Alter. Die Kurve P_y^w stellt die Anzahl der von einer Frau im Altersjahr y lebend geborenen Mädchen dar[3].

Das Integral

$$\int_0^\omega P_y^w\,dy$$

wird «rohe Reproduktionsziffer» genannt und ist gleich 1,135 Töchter pro Mutter im Jahre 1958.

Wir entnehmen aus den experimentellen Werten von Abs. 3 und den statistischen Messungen von c)

$$A^w = 0{,}06_4\,\mu\text{C Ra} \qquad A^m = 0{,}14_4\,\mu\text{C Ra}$$

und

$$D_1^w = 65\ \text{mr}/\mu\text{C}\cdot y \qquad D_1^m = 70\ \text{mr}/\mu\text{C}\cdot y.$$

Daraus ergibt sich für die genetische Dosis pro Generation

Anteil des Vaters = 91,4 mr
Anteil der Mutter = 9,3 mr
Totale genetische Dosis = 100,7 mr,

also rund 100 mr für die genetische Dosis der Armbanduhren und 3,3 mr für die jährliche Gonadendosis derselben, wenn man den üblichen Wert von 30 Jahren für die Dauer einer Generation annimmt. Es ist zu bemerken, dass der Anteil der Mutter an der Strahlendosis nur einen Zehntel des Anteils des Vaters beträgt. Da eine erste Überschlagsrechnung zeigt, dass die jährliche Gonadendosis, die von den Weckern herrührt, 0,4 mr beträgt, ergeben sich für die *jährliche Gonadendosis*, die von den gesamten Leuchtzifferblättern geliefert wird, gegenwärtig *3,7 mr* $\pm$ *25%* (berufliche Expositionen ausgeschlossen). Dieser Wert befindet sich an der unteren Grenze einer Schätzung, die wir im Jahre 1958 veröffentlicht haben[1].

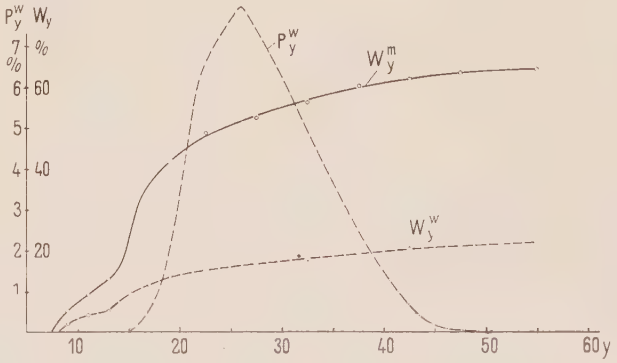


Abb. 5. Kurven der Wahrscheinlichkeit W_y^m und W_y^w dafür, dass ein Mann oder eine Frau im Altersjahr y eine Armbanduhr mit Leuchtzifferblatt trägt. P_y^w = Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine Frau im Altersjahr y eine Tochter gebiert.

[2] Recommendations ICRP Pergamon, Sept. 1958, p. 14.

[3] Die Werte für den Jahrgang 1958 sind uns durch das Eidgenössische Statistische Amt mitgeteilt worden.

Dieser Wert liegt sehr nahe dem des aktiven Niederschlags einerseits und anderseits dem der Gonadendosis, die in der Schweiz bis 1959 von den Röntgenapparaten für Schuhdurchleuchtung herrührt (3,5 mr pro Jahr)[1].

Im Frühling 1958 schätzte Libby[4] die jährliche Gonadendosis des Niederschlags (^{137}Cs und nicht unterscheidbare Radioelemente) auf 3 bis 4% der natürlichen Strahlung der Ambianz (also auf 4 bis 6 mr). Allein für ^{137}Cs fand Marley[5] im Jahre 1957 in England eine mittlere Aktivität des Menschen von 5,4 mμC, was 35 $\mu\mu$C/g Kalium entspricht, mit einer jährlichen Gonadendosis von etwa 1 mr. Mitte 1958 gaben für USA Langham und Anderson[6] für ^{137}Cs eine Gonadendosis von 1 bis 2 mr, was 45 $\mu\mu$C/g Kalium entspricht[7].

Es bestätigt sich also, dass die von den Leuchtzifferblättern ausgehende Gonadendosis bei der gesamten Bevölkerung zwar nicht sehr hoch ist, aber doch ungefähr derjenigen gleichkommt, die vom aktiven Niederschlag herrührt und ebenfalls einer Kontrolle unterzogen werden muss.

Summary

In 24 persons, men and women, the gonade dose corresponding to a defined radium charge on the wrist was measured. The β- and γ-radioactivity of more than 300 watches and clocks was analysed and the average activities determined. The proportion of men and women in Switzerland wearing luminous watches or having luminous clocks, was statistically determined in function of age. For the whole of the Swiss population, the *genetic dose* for a generation (30 years) amounts to 100 mr $\pm$ 25%.

[4] W. F. Libby, in *Symposium über schädliche Wirkungen schwacher Strahlendosen* (Benno Schwabe, Basel 1958), p. 309.

[5] W. G. Marley, in *Symposium über schädliche Wirkungen schwacher Strahlendosen* (Benno Schwabe, Basel 1958), p. 434.

[6] W. Langham und E. C. Anderson, in *Symposium über schädliche Wirkungen schwacher Strahlendosen* (Benno Schwabe, Basel 1958), p. 434.

[7] Es ist aber zu bemerken, dass die γ-Strahlendosis, die vom Depot des aktiven Niederschlags auf der Oberfläche der Erde herrührt, hier nicht berücksichtigt wird. Nach den Messungen von Peirson und Salmon[8] und den Messungen und Voraussetzungen von Spiers[9] betrug diese zusätzliche γ-Strahlendosis Mitte 1959 etwa 3 mr pro Jahr; nach Spiers[9] steigt dieser Anteil der Gonadendosis zur gleichen Zeit um 2 bis 4 mr pro Jahr.

[8] D. H. Peirson and L. Salmon, Nature *184*, 1678 (1959).

[9] F. W. Spiers, Nature *184*, 1680 (1959).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi communicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Preparation of Monoaminoxydase[1]

The importance of monoaminoxidase in a variety of clinical conditions has recently been emphasized by studies of its inhibitors[2]. Review of the literature[3,4] revealed an extensive body of information concerning inhibitors and the kinetics of the enzyme, but it was felt that there was a paucity of knowledge concerning the preparation of a stable source of enzyme[3]. Almost all monoaminoxidase activity is found in mitochondria[5,6] and by differential centrifugation an accurate mitochondrial phase isolation is possible. Recent work of the authors necessitated a simple and reliable method for preparing the enzyme from kidney tissue. The purpose of this paper is to report such a method.

Method. Rabbit or dog kidney was removed surgically, sliced, weighed, and then homogenized in a high speed blendor with four volumes of 0·25 *M* sucrose after the pH had been adjusted to 7 with potassium hydroxide (this was necessary because kidney brei is acid[7]). The kidney brei was then placed in a 50-ml vitrex tube and the preparation further homogenized for 1 min with a motor driven pestle. The brei was centrifuged for 10 min at 700 *g* and the sediment discarded. The supernatant was again centrifuged for 10 min at 700 *g* and the sediment discarded. The resulting supernatant was centrifuged for 20 min at 11000 *g*. After discarding the supernatant, the sediment was washed with 10–20 cm^3 of 0·25 *M* sucrose and spun down at 11 000 *g* for an additional 20 min. All of the above procedure was performed in a cold room. The final precipitate (mitochondrial phase) was weighed and suspended in 0·067 *M* phosphate buffer at pH 7·4 (1 cm^3 of buffer was used for each 50 mg of wet sediment). This suspension was quick-frozen, lyophilized, and the resulting powder stored at – 10° C.

Enzymatic activity was tested manometrically in a Holdane-Warburg apparatus utilizing potassium cyanide and semicarbazide as inhibitors of other enzymes[8]; the substrate was tyramine. A number of determinations on the same sample on successive days as well as at several monthly intervals were made.

[1] This investigation was supported in part by the United States Public Health Service, Grant H 444 (C 9) and by United States Army Grant DA-49-007-MD-429.

[2] Ann. N. Y. Acad. Sci. *80*, 551 (1959).

[3] H. Blaschko, Pharmacol. Rev. *4*, 415 (1952).

[4] E. A. Zeller, *The Enzymes, Chemistry and Mechanism of Action*, Vol. II, Part I (J. B. Sumner and K. Myrback, Academic Press Inc. New York 1951), p. 536.

[5] H. Blaschko, J. M. Hagen, and P. Hagen, J. Physiol. *139*, 316 (1957).

[6] G. C. Cotzias and V. P. Dole, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *78*, 157 (1951).

[7] D. E. Green, W. F. Loomis, and V. H. Auerbach, J. biol. Chem. *172*, 389 (1948).

[8] N. H. Creasey, Biochem. J. *64*, 176 (1956).

Discussion. During the differential centrifugation all fractions were tested for enzymatic activity. There was no activity found in any of the discarded fractions.

In the authors' experience this method has proven rapid, reliable, and simple to perform. The Table demonstrates that after 6 months and 13 months the enzymatic activity was essentially unchanged from the initial determination. The acetone-powder method produces a relatively unstable preparation in Warburg blanks, whereas our method showed no activity in the enzyme blanks. In addition, the influence of acetone on monoaminoxidase is still in doubt[3]. Finally, preparation of the enzyme from the 'large granular fraction'[5] where it is found seems a more logical approach than utilizing whole kidney tissue.

Monoaminoxidase activity before and after prolonged storage

Preparation rabbit kidney	Microliters of O_2 uptake per mg N_2					% N_2 per mg dry preparation
	10 min	20 min	30 min	60 min	$Q\frac{O_2}{O_2}$ (N)	
1.	23	20	24	73	140	4·8
2.	26	25	27	70	148	5·1
3.	20	27	25	76	148	5·3
4.	21	24	24	74	143	5·0
5.	28	31	29	80	168	5·6
6.	25	28	26	74	153	5·0
after 6 months	25	30	26	66	147	5·0
after 13 months	30	29	26	66	151	5·0
7.	26	29	23	78	156	5·1
after 6 months	21	25	28	76	150	5·1
Mean	24·5	26·8	25·8	73·3	150·4	5·1
S. D.	3·2	3·2	1·8	4·8	7·3	0·2

C. Giordano, J. Bloom, and J. P. Merrill

Renal Laboratory, Peter Bent Brigham Hospital and Harvard Medical School, Boston (Mass.), December 15, 1959.

Zusammenfassung

Eine einfache Methode zur Gewinnung eines Extraktes (Pulver) von starker Monoaminoxydase-Aktivität aus Hunde- oder Kaninchennieren wird beschrieben. Differentiales Zentrifugieren und rasches Einfrieren sind die wichtigsten Schritte dieser Methode. Die enzymatische Aktivität des Präparates bleibt über mehrere Monate erhalten.

Struktur und Wirkung von muscarinähnlichen Verbindungen

In früheren Arbeiten wurde die grosse Ähnlichkeit der Wirkung des Muscarins und seiner Isomeren mit der des Acetylcholins beschrieben[1,2]. Besonders Muscaron, welches eine Carbonyl- an Stelle der Hydroxylgruppe im Muscarin besitzt, ist auffallend aktiv auf cholinergische Synapsen im Bereich des peripheren Parasympathicus, der autonomen Ganglien und der Muskelendplatten. Daraus lassen sich Vorstellungen über die Bindung dieser Stoffe am cholinergischen Rezeptor ableiten, nach denen mindestens 3 pharmophore Gruppen (Carbonyl- oder Hydroxylgruppe, Äther-Sauerstoff und quartärer Stickstoff) für eine maximale Wirkung notwendig sind. Diese funktionellen Gruppen müssen in eine mehr oder weniger starke Bindung mit den Pharmoreceptoren bestimmter Substrate treten, damit eine pharmakologische Wirkung zustande kommt.

Wir haben eine Reihe weiterer muscarinähnlicher Verbindungen, bei denen der Tetrahydro-Furanring durch den Thiophanring ersetzt, die Methylseitenkette fehlt oder verlängert oder der Ring nur teilweise hydriert ist, untersucht und können unsere früheren Schlussfolgerungen bestätigen und erweitern.

Zur Prüfung verwendeten wir Katzen als Ganztiere (für die Messung des Carotis-Blutdruckes, der Atmung, der Nickhautkontraktion mit und ohne präganglionäre Sympathicusreizung sowie der Gastrocnemius-Muskelzuckungen nach Reizung des N. ischiadicus) und isolierte Froschorgane ($^1/_4$ Lähmung des perfundierten Herzens nach Straub und submaximale Kontraktion des M. rectus abdominis entsprechend 5 γ/ml Acetylcholin).

Das Ergebnis dieser Versuche ist in der Tabelle zusammengefasst. Wird das Sauerstoffatom im heterocyclischen Ring durch Schwefel ersetzt, sinkt die Wirksamkeit bedeutend, auf 1/1500, ab. Gleichzeitig ist auch der Unterschied zwischen der Wirksamkeit des Thio-Analogon des Muscarins (II) mit Substituenten entsprechend der Konformation im natürlich vorkommenden Muscarin und seiner Epi-Verbindung (III) (Hydroxylgruppe in *cis*-Stellung zu einer der Seitenketten) nicht mehr 100–300fach (Muscarin/Epi-Muscarin[1]), sondern nur noch 1,7–2fach. Ein ähnliches Verhalten ist bei *trans*- und *cis*-Desmethyl-Muscarin (VI, VII) und den entsprechenden Thio-Analoga zu beobachten, indem hier der Wirkungsunterschied von 7 auf 2 vermindert wird.

Bemerkenswert ist die 3fache *Wirkungssteigerung* durch Entmethylierung bei den Thio-Analoga (IV, V), während wir früher für die gleiche Veränderung bei Muscarin und dessen Derivaten 100fache Verminderung feststellten[3]. Kettenverlängerung bis zur Propyl- oder Isobutylgruppe (VIII, IX, X) verkleinert die Aktivität entsprechend dem Volumen und der sterischen Stellung der Substituenten.

Trans-4, 5-Dehydro-Muscarinjodid (XI) ist etwa gleich wirksam wie D, L-Muscarin. Die isomere *cis*-Verbindung (XII) ist etwas weniger aktiv, wobei diese Verminderung ähnlich, aber umgekehrt wie beim Wechsel von Allo-Muscarin zu Epiallo-Muscarin ist.

Diese Resultate können wie folgt diskutiert werden:

Die von Jellinek[4] mit Röntgenanalyse ermittelte Raumform des Muscarins ergab, dass das O-Atom des Tetrahydrofuranringes mit den benachbarten C-Atomen einen Bindungswinkel von 109° bildet und von diesen 1,47 Å entfernt ist. Beim 1,4-Dithion beträgt der Bindungswinkel des S-Atoms zu den C-Atomen 99° und die Distanz 1,81 Å[5]. Für das Thio-Analogon des Muscarins (II) ist daher anzunehmen, dass das S-Atom in einem etwas spitzeren Winkel weiter aus dem 5-Ring herausragt als beim Muscarin (Abb.). Dazu kommt, dass der van-der-Waals-Radius für Schwefel 1,85 Å beträgt, für Sauerstoff nur 1,4 Å[6], so dass das Thiophanringsystem ca. 35% grösser ist.

[1] P. G. Waser, Exper. *14*, 356 (1958).

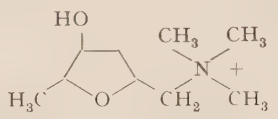
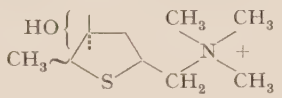
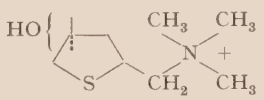
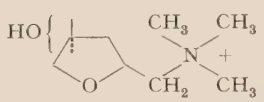
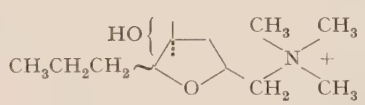
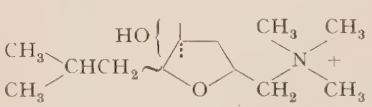
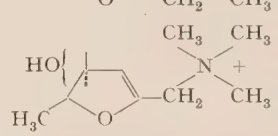
[2] L. Gyermek und K. R. Unna, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *98*, 882 (1958).

[3] G. Zwicky, P. G. Waser und C. H. Eugster, Helv. chim. Acta *42*, 1177 (1959).

[4] F. Jellinek, Acta cryst. *10*, 277 (1957).

[5] R. E. Marsh, Acta cryst. *8*, 91 (1955).

[6] L. Pauling, *The Nature of the Chemical Bond* (Cornell University Press, Ithaca 1944), p. 64 und 189.

	Formeln	Wirksamkeit bei Katzen, γ/kg i. v. (Minimaldosen) Blutdruck-senkung	Atmungs-ver-stärkung	Nickhaut-kontrak-tion	Muskel-lähmung (atropinisiert)	bei isolierten Froschorganen γ/ml Perfusions- oder Badflüssigkeit Froschherz $^1/_4$Lähmung	Froschrectus submaximale Kontraktion
I[a]		0,01	0,05	1,2	>10000	0,02	> 500
II[b]		15,0	250	>4000	> 4500	500	>2000
III[b]		25,0	500	>5000	> 5000	1000	>1000
IV		5,0	300	200	> 3000	100	>1000
V		10,0	200	200	> 5000	200	>1000
VI[c]		1,0	20	100	>10000	30	--
VII[c]		7,0	200	800	2000	400	—
VIII[d]		0,5	2	> 200	> 200	50	—
IX[d]		30–100	2000	>2000	> 2000	1000	—
X[e]		200–400	1–4000	>4000	> 4000	>1000	—
XI[f]		0,01	0,2–1,0	3	> 500	0,2–0,3	50
XII[f]		0,02	1,0	5	> 500	0,4	> 100

Die Verbindungen II, III, IV, V, VIII, IX, X wurden von C. H. Eugster und K. Allner synthetisiert und uns in verdankenswerter Weise zur pharmakologischen Prüfung zur Verfügung gestellt. Für die Verbindungen XI und XII danken wir Herrn Dr. F. Häfliger, J. R. Geigy AG., Basel.

[a] D,L-Muscarinjodid [C. H. Eugster, Helv. chim. Acta *40*, 2462 (1957)]. [b] Stellung der Methylgruppe noch nicht abgeklärt. [c] *trans*- und *cis*-Desmethylmuscarinjodid [G. Zwicky, P. G. Waser und C. H. Eugster, Helv. chim. Acta *42*, 1177 (1959)]. [d] Nicht vollständig isomerenfrei. [e] Transreiches Isomerengemisch. [f] *Trans*- und *cis*-4,5-Dehydromuscaronjodid [R. Denss, E. Girod, F. Häfliger und C. H. Eugster, Helv. chim. Acta *42*, 1191 (1959)].

Viel wichtiger ist die grössere Elektronegativität des Ring-Sauerstoffs (3,5) gegenüber Schwefel (2,5), die ersteren befähigt, mit benachbarten Aminen oder Hydroxylgruppen stabile Wasserstoffbrücken zu bilden, die anscheinend für die biologische Wirkung wesentlich sind. Zum S-Atom sind nur sehr schwache Wasserstoffbrücken möglich.

Die 3mal stärkere Wirksamkeit der stereoisomeren Desmethylverbindungen gegenüber den Thio-Analoga des Muscarins kann auch damit erklärt werden, dass die geometrischen Verhältnisse des Thiophanrings verschieden von denen des Tetrahydro-Furanrings sind und damit der Methylsubstituent in einer anderen Lage ist. Vielleicht wird durch die Wasserstoffbrücke des Äther-Sauerstoffs im Muscaron das Rezeptorprotein so deformiert, dass die Methylgruppe des Muscarons genau hineinpasst und diese Deformierung verstärkt. Desmethyl-Muscarin ist dementsprechend 50mal weniger aktiv. Eine Verlängerung der Acetylcholinkette im Muscarin (Propyl- und Isobutylver-bindungen) vermindert ebenfalls die Wirkung, wobei anscheinend eine gewisse Stereospezifität gewahrt bleibt. Diese Resultate stimmen mit der für maximale cholinergische Wirkung notwendigen 5-Atomketten-Regel von Alles und Knoefel[7] sowie Ing[8] überein, ohne dass damit der Methylgruppe eine pharmophore Funktion zugesprochen werden muss[9].

Aromatisierung des Tetrahydro-Furanrings verändert die Wirksamkeit wenig, wie schon von Ing *et al.* für

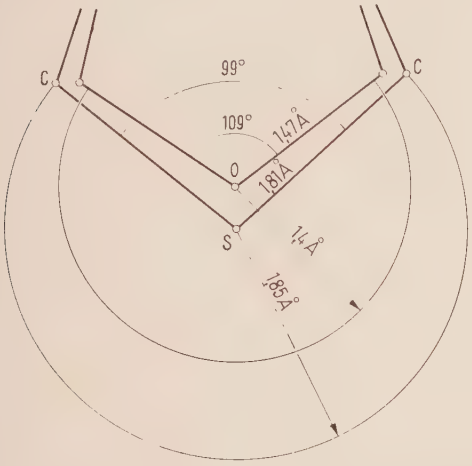
[7] G. A. Alles und P. K. Knoefel, Univ. Calif. Publ. Pharmacol. *1*, 187 (1939).

[8] H. R. Ing, Science *109*, 264 (1949).

[9] L. Gyermek und K. R. Unna, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *128*, 30, 37 (1960).

[10] H. R. Ing, P. Kordik und D. P. H. Tudor Williams, Brit. J. Pharmacol. *7*, 103 (1952).

Furfurylverbindungen (5-Methylfurfuryltrimethylammonium und Furfuryltrimethylammonium) festgestellt wurde[10]. *Trans*-(4, 5)-Dehydro-Muscarin (XI) ist etwa gleich wirksam wie das vollständig hydrierte Muscarin, die *cis*-Verbindung analog dem Epi- oder Epiallo-Muscarin weniger aktiv. Die Stellung der beweglichen basischen Seitenkette hat auf die Wirksamkeit wenig Einfluss, sofern sie nicht in *cis*-Stellung zur Hydroxylgruppe steht. Ähnliche Überlegungen gelten für die Stellung der Methylseitenkette.



Struktur des Tetrahydrofuranringes im Muscarin verglichen mit der wahrscheinlichen Struktur des Tetrahydro-Thiophenhomologen.

P. G. Waser

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, 18. März 1960.

Summary

Replacing the tetrahydrofuran ring in muscarine by tetrahydrothiophene results in a markedly reduced biological activity. This may be explained by the inability of the sulfur atom to form hydrogen bonds with the cholinergic receptor group. The increase in ring size also affects the position and biological function of the neighbouring methyl group. Aromaticity of the furan ring has little effect on biological activity of muscarine, in contrast to the striking decrease which occurs when methyl or trimethylammonium groups are in *cis*-position with respect to the hydroxy-group.

Paper Electrophoresis of Soluble Proteins of Rat Liver Mitochondria

The presence of soluble proteins in mitochondria has been described recently by several authors. Hogeboom and Schneider[1] have succeeded in separating 4 protein components from rat liver mitochondria by ultra-centrifugation of sonically disrupted particles. De Lamirande *et al.*[2] have found by free electrophoresis 5 protein fractions in extracts of rat liver mitochondria obtained by incubating the particles for several hours in a barbiturate buffer. Congiu[3,4] has recently succeeded in separating by free electrophoresis at least 7 protein components from mitochondria disrupted by a non-ionic tensioactive substance, Triton X-100.

The present paper deals with the paper electrophoresis of soluble proteins from rat liver mitochondria. The results obtained show the presence in these particles of at least 5 protein components, of 3 lipoproteins, and of 3 glycoproteins.

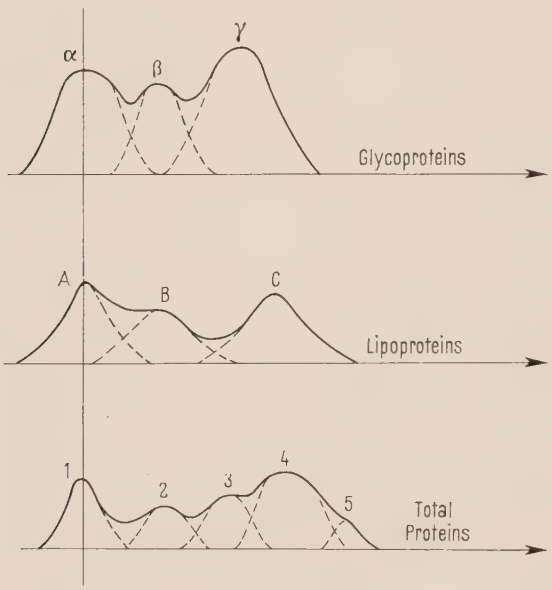
14 Wistar albino rats were used weighing 160 ± 15 g and fed on a semi-synthetic diet. They were killed by bleeding. The liver was immediately removed and transferred in the cold room at 2°C. Mitochondria were isolated from 5 g of the organ by centrifugation of 25% homogenates prepared in a Potter-Elvehjem type apparatus with 0·25 *M* sucrose. The centrifugation scheme was the same as that used by Congiu[3]. No attempt was made to collect separately the mitochondrial fractions as suggested by De Duve *et al.*[5]. Mitochondria were washed once with 0·25 *M* sucrose and then suspended in 0·5 ml of the Michaelis buffer, prepared according to Grassmann *et al.*[6]. Its ionic strength was 0·1 μ and the pH was 8·6. 0·1% Triton X-100 was added to this buffer in order to disrupt mitochondria. The final volume was 1·8 ml. The mixture was stored at 2°C for 15 min and then centrifuged at 20000 g for 15 min. The supernatant fluid was used for paper electrophoresis, immediately after this time. In fact, incubation at room temperature for short time results in a rapid aggregation of the proteins. Whatman No. 1 paper strips 25 cm long and 4 cm wide were used. The extract was placed on previously moistened strips in the amount of 10 μl in the case of total proteins, of 40 μl in that of lipo- and glycoproteins. Electrophoresis was run in a plexiglass box with platinum wire electrodes. Michaelis barbiturate-acetate-HCl buffer, ionic strength 0·1 μ and pH 8·6, was the fluid phase. The applied current was 0·2 mA, at 125 V for 12 h at 2°C in the cold room. The strips were then removed and dried in an oven at 95°C for 15 min. Staining of the proteins was made by 1% bromophenol blue in ethanol saturated with $HgCl_2$. Differentiation of the spots was carried out with 0·1% acetic acid. Lipoproteins were stained by a saturated solution of Sudan Black B in 60% ethanol and differentiated by 60% ethanol. Glycoproteins were detected according to the method of Romani[7].

The optical density of the spots was then read in an Elphor apparatus after treatment of the strips with vaseline oil. Diagrams were constructed with the results obtained. The percentage distribution of single fractions was estimated by measuring on each diagram the area of the Gauss curves corresponding to each peak. The form of the patterns is given in the Figure, in which each of them represents the average of at least 5 measurements.

Paper electrophoresis pattern of total proteins consists of at least 5 components. Relative percentages, ± standard deviation, were: 15·3 ± 7·4 for peak No. 1, 16·3 ± 5·1 for No. 2, 19·5 ± 1·8 for No. 3, 45·2 ± 12·2 for No. 4, 3·8 ± 2·8 for No. 5. The form of the pattern is comparable with that obtained by Congiu, who used free electrophoresis. The number of peaks is, however, less than that described by this author. It seems probable that peaks No. 2, 3, and 4 of paper electrophoresis correspond to those described as 'central group' by Congiu. The form of

[1] G. H. Hogeboom and W. C. Schneider, Science *113*, 355 (1951).
[2] G. De Lamirande, C. Allard, and A. Cantero, Cancer *6*, 179 (1953).
[3] L. Congiu, G. Biochim. *8*, 261 (1959).
[4] L. Congiu, G. Biochim., in press.
[5] C. DeDuve, R. Gianetto, F. Appelmans, and R. Wattiaux, Nature *172*, 1143 (1953).
[6] W. Grassmann, K. Hannig, and M. Knedel, Dtsch. med. Wschr. *76*, 333 (1951).
[7] D. Romani, Pr. méd. *62*, 1578 (1954).
[8] M. A. Dianzani Mor, Exper. *15*, 461 (1959).

the pattern of the soluble proteins from rat liver mitochondria is, however, different from that of rat muscle sarcosomes as recently reported by Dianzani Mor[8]. The lipoprotein pattern consists of at least 3 components. The first of them (A) occupies on the strip the same position as peak No. 1 of the total protein pattern. The second one (B) occupies the same position as peak No. 2; the position of the third one (C) corresponds to that of peaks No. 3 and 4. Relative percentages of lipoprotein components were respectively: 37·1 ± 7·9 for A, 32·2 ± 4·7 for B, and 30·7 ± 5·3 for C.



Total, lipo-, and glycoprotein diagrams of rat liver mitochondria extracts. The values on the abscissa represent the translation in mm; those on the ordinata represent the photometric absorption measurements. A factor 4 was applied in the case of glycoproteins.

The glycoprotein pattern consists of 3 peaks. Their position on the strip corresponds to that of lipoproteins peaks. Relative percentages were: 27·4 ± 5·7 for α, 26·3 ± 4·4 for β, and 46·2 ± 1·4 for γ.

In order to investigate the possible influence of sucrose on the concentration of glycoproteins in the mitochondrial extract, some experiments were run in which mitochondria were isolated from homogenates prepared with 0·125 *M* KCl instead of 0·25 *M* sucrose. No difference was found with respect to the mitochondria isolated from sucrose medium.

G. Ugazio

Istituto di Patologia generale, Università di Cagliari (Italy), January 30, 1960.

Riassunto

Mediante elettroforesi su carta si dimostra la presenza nei lisati di mitocondri di fegato di ratto di almeno 5 componenti proteici. Le colorazioni specifiche dimostrano la presenza di 3 frazioni lipoproteiche e di altrettante glicoproteiche. I lisati dei mitocondri vennero ottenuti qer trattamento delle particelle con Triton X-100.

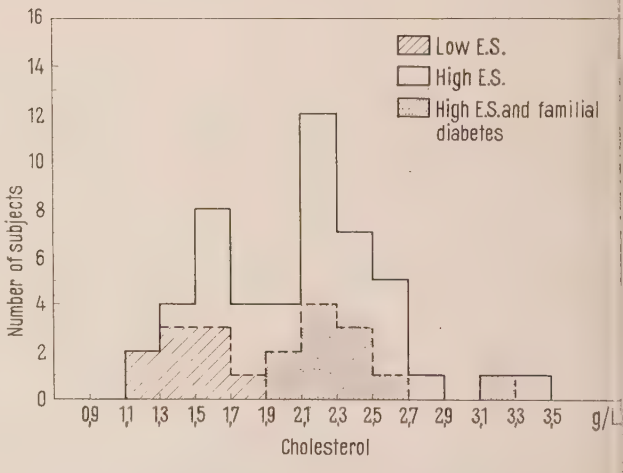
Normal Values of Plasma Potassium, Sodium, Cholesterol and Proteins and of Bloo Glucose in South Indian People, in Reference t Western Standards

No systematic studies have been made so far to com pare the normal blood composition of South Indian peopl with western standards, used as a reference. The presen work is a preliminary investigation in this field.

Venous blood was taken before breakfast from 49 mal Indians of Madras, all students or physicians, except fo 9 who were servants of low economic status. Plasma separated from heparinized blood by centrifugation, wa analyzed for K and Na by flame photometry, for chole sterol by Crawford's modification of the method o Zak[1] and for protein by Kjeldahl. Blood glucose wa determined by the Folin and Wu method[2]. A few deter minations were also made with 11 males of the white rac (European or American) living in Madras.

Results are summarized in the Table. The individua values are spread symmetrically around their mean, an no significant difference is observed between Indian stu dents or physicians, Indian servants, and white people except for cholesterol. As shown in the Figure, these latte values are divided into two groups. The 9 Indians of lo economic status are in the group of lower values, whil eleven people with a familial diabetic background are a in the higher group. This distribution is statistically significant.

Our results fall in the normal range of western stand ards. Nevertheless, a group of 20 male Belgians of th same mean age as our Indian population show K value significantly lower (15.1 ± 1.59 mg %; Henrotte[3]). Th similarity of K values in Indians and Westerns in Madra



Distriubtion of cholesterol values (in g/l) in the Indian population Low E. S. = Indian servants of low economic status. High E. S. = Indian students or physicians of high economic status. High E. S and familial diabetes = same as the latters but revealing the occur rence of one diabetic or more in their family.

[1] W. Crawford, Clinica chim. Acta *3*, 357 (1958).
[2] O. Folin and H. Wu, J. biol. Chem. *41*, 367 (1920).
[3] J. G. Henrotte, unpublished results.
[4] W. Radsma, Festschrift Nocht (Hamburg 1937), quoted i H. C. Friedman, Lancet *2*, 262 (1954).
[5] J. Leschi, *Races mélanodermes et leucodermes*, Thèse Science 1951 (Masson, Paris 1952).
[6] J. G. Henrotte, G. Krishnamurthi, and G. Ranganathan to be published in Nature.
[7] W. S. Spector, *Handbook of Biological Data* (W. A. Saunder Cy 1956).

	Indians				*Westerns*			
	m	σ	E. V.	*n*	*m*	σ	E. V.	*n*
K, mg %	17.90	1.54	21.23– 14.68	45	17.80	1.36	19.60– 15.88	9
Na, mg %	335.6	14.9	364.7 –302.0	47	334.7	14.3	350.0 –327.5	11
Glucose, mg %	92.01	10.48	115.0 – 76.0	41	91.0	6.12	100.0 – 83.0	10
Cholesterol, mg %								
total	206.8	46.8	318.0 –129.0	49	221.0	50.4	299.0 –134.0	11
lower group	156.0	19.0	180.0 –129.0	18	—	—	—	—
higher group	236.0	29.5	318.0 –190.0	31	—	—	—	—
Proteins, g %	7.56	0.45	8.33– 6.66	44	7.36	0.40	7.92– 6.74	11
Age, years	23.4	5.85	38 – 18	72	31.9	6.5	45 – 25	11

m = mean; σ = standard deviation; E.V. = extreme values; *n* = number of subjects; % = 100 per cm³

indicates that the slight hyperpotassemia observed in Madras by comparison with our European series depends upon a climatic factor, as confirmed by RADSMA[4] in Indochina. However, in Dakar, LESCHI[5] finds higher K values in Negroes than in western people and suggests the racial origin of this difference. The hyperpotassemia found in tropical countries might be in relation to a lower adrenal gland activity (HENROTTE *et al.*[6]).

On the other hand, the low cholesterol group of Indians has values much inferior to our results and to western data (195 to 230 mg%, SPECTOR[7]; 233 ± 40 mg%, HENROTTE[3]). Age and food habit (vegetarian or non-vegetarian diet) are similar in the two Indian groups and cannot explain their difference of cholesterolemia. Only 6 of the 9 servants have a diet poorer in calories and fats. Possibility of a racial factor in this matter is under further investigation.

Our research also indicates a correlation between high plasma cholesterol and diabetic familial background.

We acknowledge with thanks the technical facilities provided for our work by Professor K. P. ANANDAN and N. VERGHESE.

J. G. HENROTTE, G. RANGANATHAN, and G. KRISHNAMURTHI

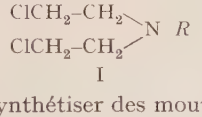
Department of Physiology and Biochemistry, Madras Medical College, Madras, and Laboratoire de Pathologie et Thérapeutique générales, University of Liège (Belgique), le 21 mars 1960.

Résumé

La composition sanguine d'une cinquantaine d'Indiens du Sud, mâles, adultes et en bonne santé, est comparée aux standards occidentaux. Les valeurs de glucose sanguin, protéines et sodium plasmatiques des Indiens sont semblables à celles des Occidentaux, leur potassémie est plus élevée et la cholestérolémie montre un groupe de valeurs très basses. La signification de ces différences est brièvement discutée.

Propos sur une nouvelle moutarde azotée

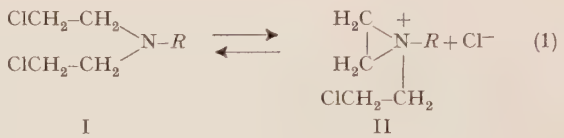
Il est bien connu que les moutardes azotées (I) ont une action cytostatique nette. Malheureusement, la toxicité de ces composés en rend le maniement très délicat.



I

On a cherché à synthétiser des moutardes azotées dont l'action cytostatique ainsi que la toxicité soient dissimulées sous un «masque» qui puisse tomber plus facilement dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales de l'organisme. Mais, jusqu'à présent, les résultats ne sont pas satisfaisants.

Il est bien connu que la molécule de moutarde azotée est en équilibre avec un ion de cyclodiméthylène-ammonium (II), et que l'activité de la moutarde azotée est due aux réactions du ion II avec les groupements actifs des protéines (NH_2, SH, CO_2H).

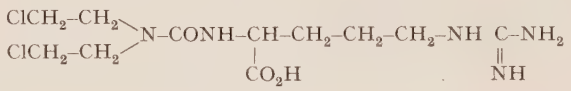


(1)

I II

Donc, la moutarde azotée sera active dans la mesure que l'équilibre (1) sera déplacé vers la droite. Cet équilibre peut être rétrogradé si on fait diminuer la basicité de l'atome d'azote, en formant un groupement carbonamide.

La N-α-di(β-chloréthyl)-carbamyl-L-arginine (III) formera si difficilement un ion du type II, qu'elle sera pratiquement dépourvue tant d'action cytostatique que de toxicité.



III

Mais dans l'organisme, sous l'action de l'amidase appropriée, III sera scindé en L-arginine et en acide di(β-chloréthyl)-carbamique (IV), composé extrêmement instable, qui se décarboxylera immédiatement en passant en di(β-chloréthyl)-amine (V). Or, V est extrêmement actif et pas tellement toxique.

IV V

Lorsque l'activité amidasique du tissu néoplasique est bien plus intense que celle du tissu sain correspondant[1,2] dans les cellules cancéreuses il se formera toujours une quantité bien plus élevée de composé V que dans les cellules normales de l'organisme.

La teneur en L-arginine du tissu néoplasique est supérieure à celle du tissu sain correspondant. La L-arginine accroît l'index mitotique du tissu néoplasique, mais ne modifie pas l'index mitotique du tissu sain[3]. Par consé-

[1] J. P. GREENSTEIN and F. M. LEUTHARDT, J. nat. Cancer Inst. *8*, 77 (1947).

[2] P. C. ZAMECNIK and M. L. STEPHENSON, Cancer Res. *7*, 326 (1947).

[3] S. J. BACH and I. LASNITZKI, Biochem. J. *40*, xlviii (1946); Enzymologia *12*, 198 (1947).

quent, la L-arginine libérée par l'hydrolyse du III rendra la cellule cancéreuse encore plus susceptible à l'égard de V.

C.-S. Dongorozi

Bucarest (Roumanie), str. Viitorului 171, le 18 septembre 1958.

Zusammenfassung

Es wird vorgeschlagen, N-α-di-(β-chloräthyl)-carbamyl-L-arginin (III) als neues Stickstofflost auf cytostatische Wirkung zu untersuchen; dies in der Erwartung, dass III in Krebszellen in höherem Masse zum cytostatisch wirkenden Di-(β-chloräthyl)-amin (V) hydrolysiert wird als in normalen Zellen. Das gleichzeitig freiwerdende L-Arginin sollte die Krebszelle noch empfindlicher gegen V machen.

Enzymatic Synthesis and Destruction of Carotenoids in Mango Extracts

Among the carotenogenic fruits, most of the investigations on the biosynthesis of carotenoids have been carried out on tomatoes. Mangoes, which are good carotene producers, have not been examined in such detail. The present investigation was undertaken with a view to study the general factors controlling carotenogenesis in Bombay Alfanzo mangoes. An attempt has been made to prepare cell-free extracts of the fruits which can synthesize carotenoids.

The fruits were preserved in the cold room at the temperature 0–3°C, and, in the frozen condition, the outer skin was removed; then 10 g (fresh weight) of mango pulp (after immediately neutralizing) were ground in a medium containing 0·5 *M* sucrose in 100 ml phosphate buffer (0·1 *M*, pH 7·0) at 0°C for about 10 min. The supernatant solution obtained by centrifuging the pulp at 12800 × *g* for 20 min is referred to as mango extract. 5 ml of the mango extract (containing protein concentration of about 5 mg) were incubated at 30°C in 250 ml Erlenmeyer flasks on a rotary shaker for 18 h with the desired substrates in phosphate buffer (pH 7·0, 0·1 *M*). Carotenes were extracted in freshly distilled ether. The etheral extract was freed of moisture by treating with anhydrous sodium sulphate. The carotenes were transferred in 5 ml petroleum ether (B. P. 80–100°C) and they were determined as β-carotene by measuring E 450 mμ ($E^{1\,cm}_{1\,\%}$ = 2500) in Beckman photoelectric spectrophotometer. Pure synthetic β-carotene was dissolved in minimum amount of Tween-80 and then added in the medium to study its destruction.

For estimating total acidity and sugar content of mangoes, 5 g of the pulp were completely extracted by triturating with sand and water. After filtration, from a known volume, an aliquot portion was used for the determination of sugar as glucose by Cole's method and for total acidity by titrating against 0·01 *N* sodium hydroxide using phenolphthalein as an indicator.

The results recorded in Table I show that ripe mangoes are about ten times richer in carotene than partly unripe ones; and the increase in carotene content of mangoes is accompanied by decrease in acid content and increase in sugar content. It was not possible to detect carotenoids, even in traces, from unripe green mangoes.

Mangoes which had reached full ripeness gave optimum results and therefore they were used in further investigations.

Table II lists the results of an experiment showing th enzymatic formation of carotenes from glucose and acetat in cell-free extracts. From the results of control exper ments, it can be seen that, as in the case of carrots[1], wit mangoes also, some amount of carotene originally presen (at zero time) gets destroyed during incubation.

Table III includes the results of the experiments whic show that synthetic β-carotene gets destroyed in presenc of enzymatic extract. The destruction of β-carotene wa measured by comparing the amounts present before an after reaction. In order to separate the effect of physica conditions such as light, temperature etc. synthetic β carotene was incubated in control experiments withou enzymatic extract.

Table I. Sugar, acid, and carotene content in partly unripe and rip mangoes.

Mango	Total sugar[a]	Total acidity[b]	Carotene content[c]
Unripe	4·942	41·0	488·00
Ripe	22·390	7·6	3520·00

[a] g/100 g of pulp. [b] Equivalent to 1 *N* acid/100 g of pulp. [c] μg/100 g of pulp.

Table II. Biosynthesis of carotenoids in mango extract. The test system contained final concentration of 0·1 *M* phosphat buffer pH 7·0, substrates in amount listed below and 5 ml of mang extract in a total volume of 30 ml in each 250 ml Erlenmeyer flask incubated 18 h at 30°C.

Substrate	Amount added in (mg)	Carotene amount in μ*M*		
		Zero-time	After incubation	Net change
Glucose	625	0·225	0·328	+0·103
Acetate	250	0·225	0·352	+0·127
None (Control)	—	0·225	0·127	−0·098

Table III. Enzymatic degradation of carotenoids in mango extra Conditions identical as shown in Table II.

Substrate	Amount added in μ*M*	Percentage degradation of carotenoids
Synthetic β-carotene	3·938	15·710
Synthetic β-carotene (Control enzyme omitted)	3·938	1·422

We are grateful to F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel fo the generous gift of β-carotene, to M. S. University for the award o research assistantship to one of us (D. K. P.) and for a grant toward laboratory expenses, and to Prof. C. V. Ramakrishnan for his con tinued interest in this work.

V. V. Modi and (Miss) D. K. Patwa

Biochemistry Department, M. S. University of Baroda (India), December 2, 1959.

Zusammenfassung

Eine Biosynthese von Carotin lässt sich in zellfreien karotenoidhaltigen Extrakten reifer Mangofrüchte bei Gegenwart von Glucose oder Azetat beobachten. Dabei zeigt sich gleichzeitig eine Abnahme der Karotenoide.

[1] V. V. Modi and D. K. Patwa, Nature *184*, 983 (1959).

Studies on Philippine Species of Rauwolfia

1. Isolation of Reserpine and Rescinnamine from *Rauwolfia amsoniaefolia* A. DC.

There are four Rauwolfia species reported as native to the Philippines: *Rauwolfia amsoniaefolia* A. DC., *Rauwolfia samarensis* Merr., *Rauwolfia membranacea* Merr., and *Rauwolfia loheri* Merr. Of these only the first two are available for investigation.

Rauwolfia amsoniaefolia A. DC., known in Tagalog as sibakong, is found in the thickets and secondary forests of Cagayan, Ilocos Norte, Batangas, Camarines provinces, Mindoro, Masbate, and Mindanae.

Very little is known about the alkaloidal content of this native plant species. There was a report on the preliminary phytochemical investigation on the leaves, roots, and bark of *R. amsoniaefolia* by Gomez and Carandang[1]. An isolation of a creamish, amorphous alkaloid, amsoniaefoline, was reported by Gomez, da Silva, and Garcia[2].

Experimental. Determination of the total alkaloid content of the different parts of the plant by the acetic acid method[3] gave the following results:

Stem bark	2·06%	Bark of root	4·16%
Whole root	2·44%	Leaves	0·96%
Wood of root	1·39%		

Preliminary analysis of the crude drug by paper chromatography indicated the presence of the following alkaloids: reserpine, rescinnamine, deserpidine, aricin, yohimbine, methyl reserpate, possibly ajmalicine, and an unidentified alkaloid from the stem bark. The roots showed the presence of the same alkaloids except deserpidine. However, smaller amounts of reserpine and rescinnamine were indicated for the roots.

The material used for the isolation of the constituent alkaloids was the stem bark of mature plants collected in Mindoro. The air-dried, finely ground material was percolated to exhaustion with methanol. The percolate was concentrated under reduced pressure to a volume such that 1 ml of the concentrated extract was equivalent to 1 g of the drug. The concentrated methanolic extract, after dilution with an equal volume of water, was shaken several times with chloroform. The chloroform extract was then chromatographed on alumina. The various fractions of eluate were evaporated to dryness and crystallized from methanol. Four crops of crystals were obtained (Fig. 1–4) which gave the following melting points: crystal 1, 246 to 249°C; crystal 2, 246–249°C; crystal 3, 225–227°C; crystal 4, 234–236°C.

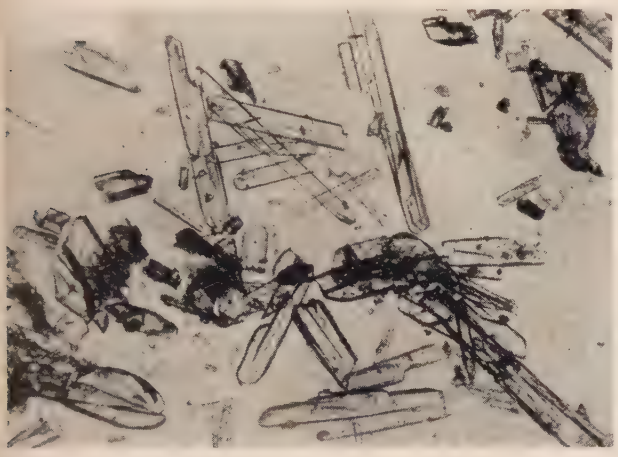


Fig. 1

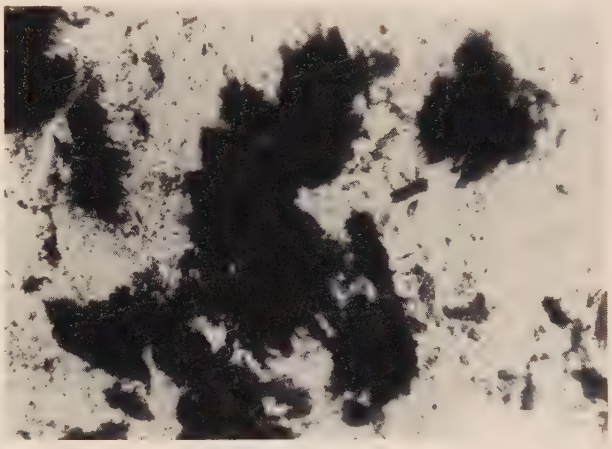


Fig. 3

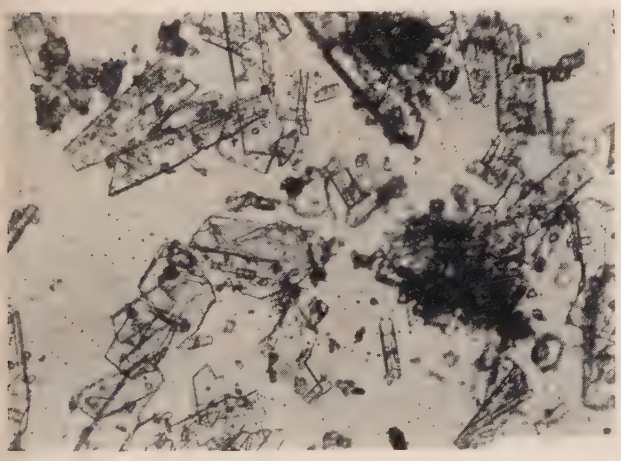


Fig. 2

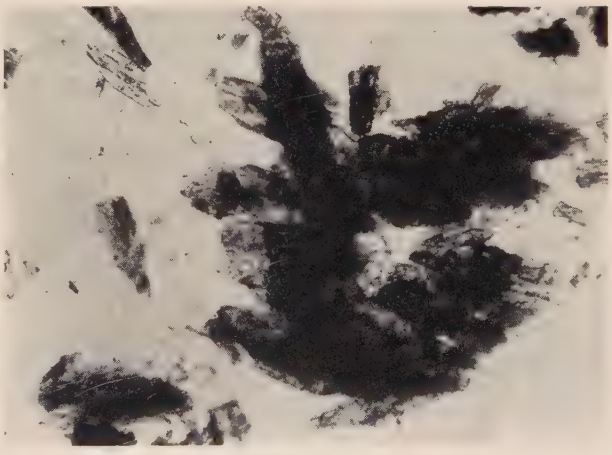


Fig. 4

[1] L. Gomez and L. V. Carandang, J. Phil. Pharm. Assoc. *43*, 102 (1956).

[2] L. Gomez, P. da Silva, and P. Garcia, J. phil. pharm. Assoc. *44*, 127 (1957).

[3] F. Neuwald and W. Loges, Arch. Pharm. *289*, 226 (1956).

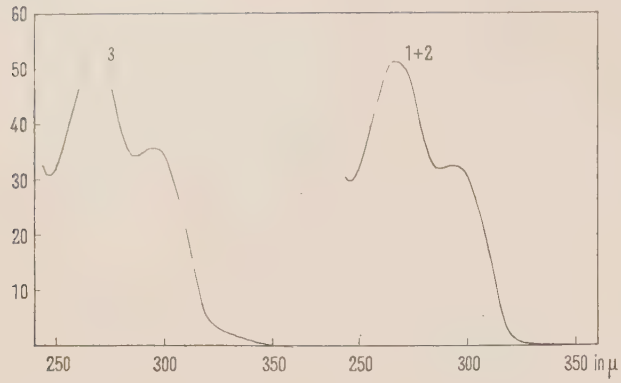


Fig. 5

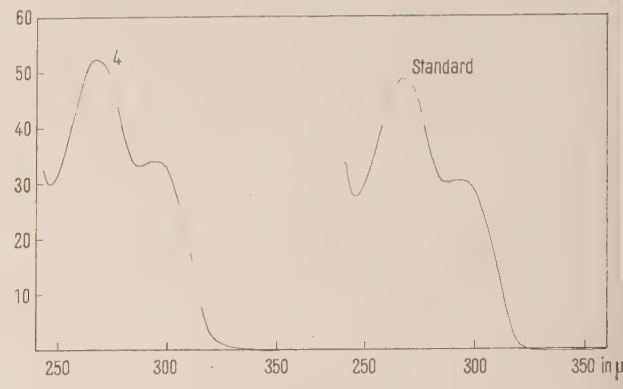


Fig. 6

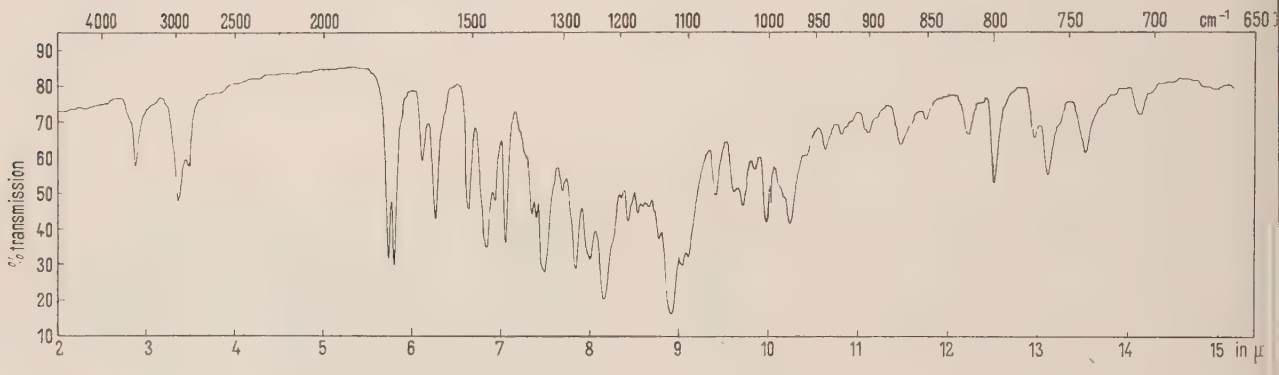


Fig. 7

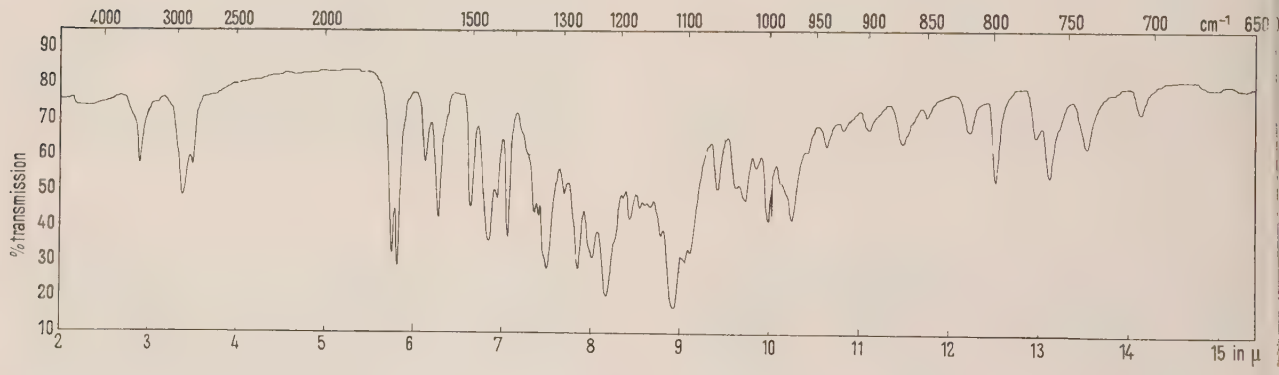


Fig. 8

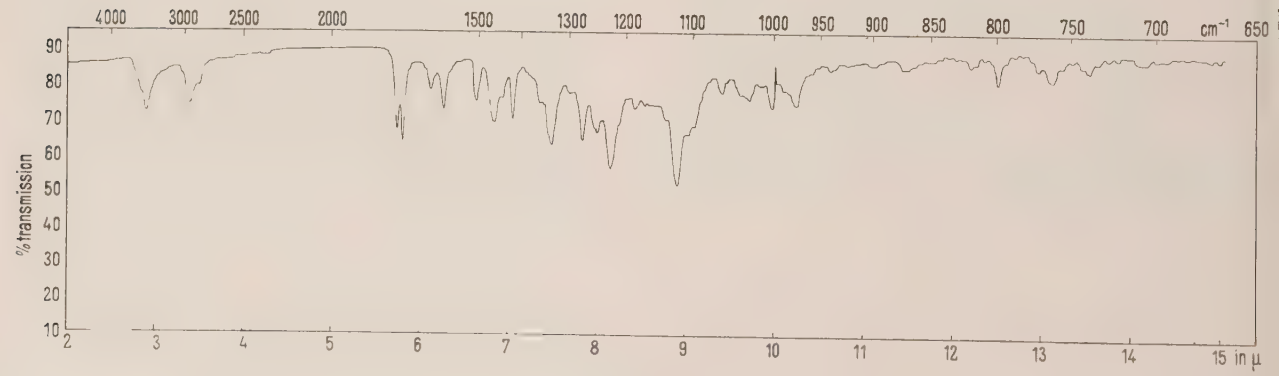


Fig. 9

The same colour reactions characteristic of reserpine and rescinnamine were given by the four crystals: with Froehde's reagent, yellow-green to blue; with concentrated sulfuric acid, slightly greenish yellow and with concentrated nitric acid, brick red turning to greenish yellow solution.

Elementary analysis yielded the following results:

Crystal 1: C 64·76, H 6·71, N 4·81
Crystal 2: C 65·30, H 6·78, N 4·08
Crystal 3: C 65·88, H 6·83, N 4·61

Crystals 1 and 2 were identified by comparison on a paper chromatogram with pure reserpine and by their ultraviolet (Fig. 5, 6) and infrared absorption spectra (Fig. 7, 8, 9). Crystals 3 and 4 were identified by paper chromatography to be mixtures of reserpine and rescinnamine. Quantitative analysis showed crystals 1 and 2 to be 99% reserpine, crystal 3 is 90% reserpine and 10% rescinnamine and crystal 4 contains 95% reserpine and 5% rescinnamine.

The elementary analyses were made by Misses Lydia Joson and Glory Lleander, NSDB, and the UV- and IR-spectra by J. Carol and staff, FDA, Washington.

R. M. Bernal, A. Villegas-Castillo, and O. P. Espejo

College of Pharmacy, University of the Philippines and National Science Development Board, Manila, August 17, 1959.

Zusammenfassung

Aus *Rauwolfia amsoniaefolia* A. DC. wurden ziemlich reines Reserpin und ein Gemisch von Reserpin und Rescinnamin isoliert und charakterisiert.

Note on the Specificity of Mercuric Bromophenol Blue for the Cytochemical Detection of Proteins

Quite recently Baker[1] has expressed some doubts on the specificity of bromophenol blue (BPB) as a protein stain. He seems to be of the opinion that whatever is stained by bromophenol blue does not necessarily contain proteins, and hence this fact does not qualify this stain to act as a reliable agent for the detection of proteins.

The purpose of this communication is to emphasize that, in addition to what Baker[1] has observed, whatever is not stained with this dye is not always devoid of proteins.

The credit of bringing this powerful acid dye to the forefront as a specific stain for various proteins goes to Mazia, Brewer, and Alfert[2], who modified the older techniques employed by Durrum[3], Kunkel, and Tiselius[4] and Geschwind and Li[5] and standardized a new technique.

I have studied in detail the mucinogenesis in the goblet cells of different vertebrates [viz., *Mystus seenghala* (fish), *Rana tigrina* (amphibian), *Hemidactylus* sp. (reptile), and the house- and white rats (mammals)]. The mucus which these cells secrete has been established histochemically as acid mucopolysaccharides (see also Pearse[6] and Palay[7]) as is evident from the following reactions (PAS +, Best's carmine –, Alcian blue[8] +, mucicarmine +, SBB –, intensely metachromatic after Feyrter's 'enclosure' method[6], and toluidine blue[6] etc. etc.). Further, mucopolysaccharides and acid mucopolysaccharides invariably contain proteins (+ after coupled tetrazonium[9]) as one of their constituents (Pearse[6] and Lillie[10]).

During the present investigations, mercuric bromophenol blue staining has been employed both on paraffin sections from the various fixatives such as Regaud, Lewitsky, Lewitsky saline[11], Champy, Helly, Zenker-formol, Zenker and Carnoy (both with and without chloroform) and gelatin sections from formaldehyde calcium[12], Lewitsky saline[11], and pyridine extracted (prior fixation in weak Bouin) material[13]. In none of the above preparations does the mucus in the thecae of the goblet cells give blue coloration with mercuric bromophenol blue technique of Mazia, Brewer, and Alfert[2].

So in the present state of knowledge, as Baker[1] has also pointed out, it is safe to regard bromophenol blue merely as a 'powerful acid dye, capable of making direct links with basic groups in tissue-constituents' and perhaps also with certain acidic groups, through mercury.

In short, whatever is stained with mercuric bromophenol blue does not always contain proteins and whatever is not stained is not necessarily devoid of proteins.

K. C. Kanwar

Department of Zoology, Panjab University, Hoshiarpur[14] *(Punjab, India), January 23, 1960.*

Résumé

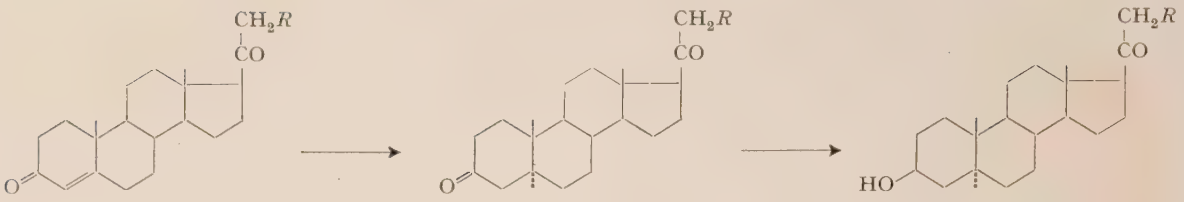
Le bromophénol mercurique bleu n'est pas un colorant spécifique des protéines. Tout ce qui est teint par lui ne contient pas toujours des protéines et tout ce qui n'est pas teint n'est pas nécessairement dépourvu de protéines.

[1] J. R. Baker, Quart. J. micr. Sci. *99*, 459 (1958).
[2] D. Mazia, P. A. Brewer, and M. Alfert, Biol. Bull. *104*, 57 (1953).
[3] E. L. Durrum, J. Amer. chem. Soc. *72*, 2943 (1950).
[4] H. G. Kunkel and A. Tiselius, J. gen. Physiol. *35*, 89 (1951).
[5] I. R. Geschwind and C. H. Li, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 834 (1953).
[6] A. G. E. Pearse, *Histochemistry* (Churchill Ltd., London 1954).
[7] S. Palay, *Frontiers in Cytology* (New Haven, Yale University Press 1958), p. 305.
[8] H. F. Steedman, Quart. J. micr. Sci. *91*, 477 (1950).
[9] J. F. Danielle, Symp. Soc. exp. Biol. *1*, 101 (1947).
[10] R. D. Lillie, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry* (The Blakiston Company Inc., New York 1954).
[11] J. R. Baker, Quart. J. micr. Sci. *97*, 621 (1956).
[12] J. R. Baker, Quart. J. micr. Sci. *85*, 1 (1944).
[13] J. R. Baker, Quart. J. micr. Sci. *87*, 441 (1946).
[14] The department has now shifted to Chandigarh.

Enzymatische Hydrierungen im Ring A von Steroiden mittels Streptomyzeten[1–3]

Die Fähigkeit, Steroide im Ring A enzymatisch zu dehydrieren, ist unter den Mikroorganismen ziemlich verbreitet[4]. Die umgekehrte Reaktion hingegen, die Hydrierung von Δ^4-3-Keto-steroiden zu den entsprechenden im

[1] 10. Mitt. über mikrobiologische Reaktionen; 9. Mitt. siehe J. Urech, E. Vischer und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 1077 (1960).
[2] 170. Mitt. über Steroide; 169. Mitt. siehe R. Neher und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 1171 (1960).
[3] Auszugsweise vorgetragen am VII. Internationalen Kongress für Mikrobiologie, Stockholm 1958.
[4] Vgl. zum Beispiel E. Vischer und A. Wettstein, Adv. Enzymol. *20*, 237 (1958).



Ia: R = OH
b: R = H

IIa: R = OH
b: R = H

IIIa: R = OH
b: R = H

Ring A gesättigten Verbindungen, wurde nur selten und meist lediglich als Nebenreaktion anderer mikrobiologischer Umsetzungen beobachtet.

Im Verlaufe von Untersuchungen über die Einwirkung verschiedener Streptomyzeten auf Δ^4-3-Keto-steroide haben wir einen Stamm gefunden, der Cortexon (11-Desoxy-corticosteron, Ia) bei 30stündiger Inkubation in guter Ausbeute in eine Substanz umwandelt, welche die charakteristische Absorption im UV nicht mehr aufweist. Sie ist im Papierchromatogramm etwas polarer als das Ausgangsmaterial und enthält noch die unveränderte Ketol-Seitenkette, nach der Elementar-Analyse aber keine zusätzliche Sauerstoffunktion. In der Folge liess sie sich als das 3β,21-Dihydroxy-allopregnan-20-on (IIIa) identifizieren.

Bei dieser enzymatischen Reaktion entstand also unter stereospezifischer Absättigung der 4,5-Doppelbindung ein Produkt der Allo-(5α)-Reihe, und zudem wurde die 3-Ketogruppe in eine β-orientierte sek. Alkoholgruppe übergeführt. Da es sich um eine für Pilze und speziell für Streptomyzeten neuartige Reaktion handelte[5], wurde sie näher untersucht.

Der verwendete Mikroorganismus kann gemäss der Klassierung von Ettlinger *et al.*[6] der Gattung *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman et Henrici[7] zugezählt werden. Er wurde für diese Umsetzungen auf einem Pepton-Fleischextrakt-Medium bei 27°C in Schüttelgefässen gezüchtet. Zu den innerhalb 24 h ausgewachsenen Kulturen gab man die zu untersuchenden Steroide in Azeton-Lösung unter sterilen Bedingungen zu, worauf bei der gleichen Temperatur inkubiert wurde. Die Umsetzungsprodukte wurden durch Extraktion mit Essigester und anschliessender Chromatographie an Silicagel in reiner Form isoliert oder in einzelnen Fällen papierchromatographisch unter Verwendung mehrerer Lösungsmittelsysteme und Farbreaktionen identifiziert.

Mit diesem Streptomyzeten konnten auch andere Δ^4-3-Keto-steroide, wie Corticosteron, 17α-Hydroxy-cortexon (Reichsteins Substanz S), Progesteron (Ib) und 16α-Hydroxy-progesteron, sowie Δ^4-Androsten-3,17-dion in die entsprechenden gesättigten 3β-Hydroxy-(5α)-Verbindungen übergeführt werden.

Bei einigen dieser fermentativen Umsetzungen wurde die Bildung von jeweils einem zusätzlichen Umsetzungsprodukt beobachtet, das sich im Papierchromatogramm etwas weniger polar als das Ausgangsmaterial erwies und das auf Grund der fehlenden UV-Absorption ebenfalls im Ring A gesättigt sein musste. Diese Produkte sind bei 18stündigen Inkubationen von Cortexon, Progesteron, 17α-Hydroxy-cortexon und Δ^4-Androsten-3,17-dion als Reinsubstanz isoliert und identifiziert worden. In allen Fällen handelte es sich um die entsprechenden gesättigten 3-Keto-(5α)-Verbindungen, offenbar die Zwischenprodukte der fermentativen Prozesse. Die Tatsache, dass diese Verbindungen bei nochmaliger Inkubation mit dem *S.-griseus*-Stamm in guter Ausbeute in die 3β-Hydroxy-Derivate übergeführt wurden, bestätigte diese Annahme.

Im Verlaufe der mikrobiologischen Umsetzung von Cortexon (Ia) und Progesteron (Ib) wurden die Konzentrationen der Ausgangsstoffe, der gesättigten 3-Keto-Derivate IIa und IIb, sowie der 3β-Hydroxy-Verbindungen IIIa und IIIb quantitativ verfolgt. Dabei zeigte sich in beiden Fällen, dass zuerst die 4,5-Doppelbindung hydriert wurde unter Bildung der 3-Keto-Derivate IIa und IIb, und dass die letzteren in einer zweiten Phase zu den entsprechenden 3β-Hydroxy-Verbindungen IIIa und IIIb reduziert wurden. Die Resultate eines solchen Experimentes sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Inkubation von Cortexon mit *S. griseus*

Zeit h	Ia	IIa	IIIa
8	50%	40%	5%
14	20%	40%	35%
24	0	25%	60%
36	0	0	85%

Die beschriebenen reduktiven Umsetzungen können selbstverständlich auch mittels bekannter chemischer Methoden durchgeführt werden. Diese erfordern aber meist den Schutz der anderen im Molekül vorhandenen reduzierbaren Gruppen, und der stereospezifische Verlauf ist nicht gewährleistet. Aus diesen Gründen kann die Anwendung der mikrobiologischen Reaktion von Vorteil sein. So konnte zum Beispiel das früher aus Nebennieren isolierte 3β,16α-Dihydroxy-allopregnan-20-on[8] in *einer* fermentativen Verfahrensstufe aus 16α-Hydroxy-progesteron gewonnen werden.

Wir danken Herrn A. Reut für die sorgfältige Ausführung der experimentellen Untersuchungen.

E. Vischer und A. Wettstein

Forschungslaboratorien der CIBA, Basel, 25. Mai 1960.

Summary

A strain of *Streptomyces griseus* has been found to convert Δ^4-3-keto steroids into the corresponding saturated 3-keto-5α-compounds and, on prolonged incubation, into the 3β-hydroxy-5α-derivatives.

[5] Neuerdings beschrieben M. Shirasaka und M. Tsuruta ähnliche reduktive Umsetzungen mit einem Stamm von *Alternaria bataticola*, vgl. Arch. Biochem. Biophys. *85*, 277 (1959).

[6] L. Ettlinger, R. Corbaz und R. Hütter, Arch. Mikrobiol. *31*, 326 (1958).

[7] Wir danken den Herren Prof. E. Gäumann, Dr. R. Hütter und Dr. H. Zähner bestens für die Überlassung und Bestimmung dieses Stammes.

[8] R. Neher, P. Desaulles, E. Vischer, P. Wieland und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *41*, 1667 (1958).

The Synthesis of Corticosteroids Methylated at C_{21}

For the most part, structural modification of the dihydroxy-acetone side-chain characteristic of anti-inflammatory steroids has been restricted to replacement of one or the other of the critical hydroxyl functions by a hydrogen, halogen, or methyl substituent[1]. Although this approach has produced a number of biologically interesting steroids, none has proved to be useful as an anti-inflammatory agent for systemic application. We have now modified the *intact* side-chain by addition of a methyl group at C_{21}, thereby introducing a critically-placed bulk factor, which also serves to incorporate the C_{21}-hydroxyl function into a new center of asymmetry[2]. This communication describes the synthesis of both C_{21}-epimers of 21-methyl-9α-fluoroprednisolone.

Introduction of the required additional carbon atom was effected directly in a complex starting material by the reaction of prednisolone 21-aldehyde[3] with diazomethane leading to a mixture of products of which the major component was 21-methyl-21, 21a-epoxy-1, 4-pregnadiene-11β, 17α-diol-3, 20-dione (I)[4,5], m. p. 239–241°C, λ_{max} 243 mμ (15,600), $[\alpha]_D$ + 166°. Opening of the oxide ring of I with halogen acids occurred primarily at the terminal atom to afford the desired halohydrins containing a hydroxyl group at C_{21}[6]. These proved to be unusually labile toward a variety of reagents. For instance, bismuth trioxide[7] did not oxidize the chlorohydrin (21-chloromethylprednisolone, II) to the expected 21-chloromethyl-20, 21-diketone, but instead gave the α-diketone, 21-methyl-1, 4-pregnadiene-11β, 17α-diol-3, 20, 21-trione (III)[8], m. p. 211–212°C (dec.), λ_{max} 243 mμ (15,500), $[\alpha]_D$ + 91°, by a novel dehydrohalogenative rearrangement. A similar transformation of the corresponding bromohydrin could be brought about simply by heating in boiling ethyl acetate.

Stereospecific reduction of III to the desired 20, 21-ketol was accomplished in good yield with fermenting yeast[9] affording after acetylation 21-methyl-1, 4-pregnadiene-11β, 17α, 21B-triol-3, 20-dione 21-acetate (IV)[10], m. p. 222–223°C, λ_{max} 244 mμ (14,800), $[\alpha]_D$ + 112°. Application of the familiar sequence for introducing a 9α-fluorine substituent[11] led in four steps to 9α-fluoro-21-methyl-1, 4-pregnadiene-11β, 17α, 21B-triol-3, 20-dione 21-acetate (V), m.p. 251–253°C, λ_{max} 239 mμ (15,350), $[\alpha]_D$ + 87°[12].

An alternative approach was used to prepare the 21-methyl epimer of V. Acidic hydrolysis[13] of 16α, 17α-epoxy-4-pregnene-21-ol-3, 20-dione acetate to the alcohol followed by periodic acid oxidation yielded 16α, 17α-epoxy-3-keto-Δ^4-etiocholenic acid (VI), m. p. 205–207°C, λ_{max} 239 mμ (16,700), $[\alpha]_D$ + 135°. Conversion of VI without isolation of intermediates through the acid chloride, subsequent treatment with *diazoethane*[14], and finally with hydrochloric acid led to 21-methyl-21-chloro-16α, 17α-epoxy-4-pregnene-3, 20-dione (VII), m. p. 200–202°C, λ_{max} 239 mμ (15,700), $[\alpha]_D$ + 124°, *apparently as a single epimer*. The action of potassium acetate in refluxing acetone on VII gave a 2:1 mixture of C_{21}-epimeric acetates from which the predominant 21-methyl-16α, 17α-epoxy-4-pregnene-21A-ol-3, 20-dione 21-acetate (VIII), m. p. 191–194°C, λ_{max} 240 mμ (17,000), $[\alpha]_D$ + 115°, could be separated by chromatography on neutral alumina. Oxide ring opening with hydrobromic acid, Raney nickel debromination[15], microbiological 11β-hydroxylation (*C. lunata*)[16], acetylation, and selenium dioxide dehydrogenation[17] afforded 21-methyl-1, 4-pregnadiene-11β, 17α, 21A-triol-3, 20-dione 21-acetate (IX) (the C_{21}-epimer of IV), m. p. 195–197°C, λ_{max} 243 mμ (13,600), $[\alpha]_D$ + 81°. Application of the standard sequence for 9α-fluorine introduction[11] gave 9α-fluoro-21-methyl-1, 4-pregnadiene-11β, 17α, 21A-triol-3, 20-dione 21-acetate (X) (the C_{21}-epimer of V), m. p. 247–248°C, λ_{max} 239 mμ (14,400), $[\alpha]_D$ + 60°[12].

Pharmacological evaluation[18] reveals V (21-methyl-9α-fluoroprednisolone, B-isomer) to be essentially devoid of electrolyte-regulating activity[19], except for causing slight *natruresis* in adrenalectomized rats. The anti-inflammatory potency of V as measured by the granuloma pouch technique[20] is about six-tenths that of 9α-fluoroprednisolone acetate. Thus, we find that the introduction of a 21-methyl substituent can completely eliminate the powerful sodium retaining properties of the parent 9α-fluoroprednisolone molecule[11,21] while retaining *systemic* anti-inflammatory activity, an effect previously accomplished in 9α-fluoro-C_{21}-oxygenated steroids only with alkyl or hydroxyl substituents at C_{16}. Interestingly, the C_{21}-epimeric compound X shows significantly lower anti-inflammatory activity.

[1] J. Fried and A. Borman, Vitam. u. Horm. *16*, 303 (1958).

[2] The adjacent C_{21}-hydroxyl function is a key determinant of electrolyte-regulating properties. Cf. J. Fried, Ann. N. Y. Acad. Sci. *61*, 573 (1955).

[3] This compound has been described as a monohydrate (B. G. Christensen *et al.*, Chem. & Ind. *1958*, 1259). Our sample (prepared by the same method) was shown by a methoxyl determination to contain one molecule of methanol.

[4] In addition to oxide I at least five by-products were generally formed in yields of less than 5%. One of these was subsequently shown to be the 20,21-diketone III described below.

[5] Satisfactory analytical results were obtained for all new compounds described in this communication. All ultraviolet absorption spectra were taken in 95% ethanol and rotations were determined in dioxane.

[6] Isomeric halohydrins, presumably containing the halogen atom at C_{21}, were invariably formed as minor products in these reactions.

[7] This bismuth-catalyzed rearrangement occurs at a lower temperature (50–60°C) than is usually required to effect acyloin oxidations (W. Rigby, J. chem. Soc. *1951*, 793), and the formation of elemental bismuth is not observed.

[8] The α-diketone system in III was demonstrated by reaction with *o*-phenylenediamine to form a derivative which exhibited an ultraviolet absorption spectrum typical of quinoxalines, such as that formed from prednisolone 21-aldehyde [W. J. Leanza *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1691 (1954)].

[9] C. Neuberg, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 4 (Academic Press, Inc., New York, N. Y., 1949), p. 86.

[10] The designation 21B is arbitrarily assigned to the product obtained by the yeast reduction of a 20,21-diketone. The other epimer is designated 21A.

[11] J. Fried and E. F. Sabo, J. Amer. chem. Soc. *79*, 1130 (1957). – R. F. Hirschmann, R. Miller, J. Wood, and R. E. Jones, J. Amer. chem. Soc. *78*, 4956 (1956).

[12] Periodic acid cleavage of this compound as the free alcohol afforded 9α-fluoro-3-keto-11β, 17α-dihydroxy-$\Delta^{1,4}$-etiocholadienic acid, identical in all respects with a sample prepared similarly from 9α-fluoroprednisolone.

[13] E. P. Oliveto, C. Gerold, L. Weber, H. E. Jorgensen, R. Rausser, and E. B. Hershberg, J. Amer. chem. Soc. *75*, 5486 (1953).

[14] A. F. McKay *et al.*, Canad. J. Res. *28B*, 683 (1950).

[15] P. L. Julian, E. W. Meyer, W. J. Karpel, and I. R. Waller, J. Amer. chem. Soc. *72*, 5145 (1950).

[16] G. M. Shull and D. A. Kita, J. Amer. chem. Soc. *77*, 763 (1955). We are indebted to Mr. J. L. Sardinas for carrying out this microbiological conversion.

[17] Ch. Meystre, H. Frey, W. Voser, and A. Wettstein, Helv. chim. Acta *39*, 734 (1956).

[18] J. G. Llaurado and J. A. Schneider, Fed. Proc. *19*, 159 (1960).

[19] J. G. Llaurado, Endocrinol. *58*, 390 (1956); Klin. Wschr. *34*, 669 (1956).

[20] The technique employed was essentially that of A. Robert and J. E. Nezamis, Acta endocrinol. *25*, 105 (1957).

[21] R. O. Stafford *et al.*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., NY *89*, 371 (1955).

The synthesis of other C_{21}-methyl steroids including the 6α-fluoro analog of V will be described in a subsequent report.

E. J. Agnello, R. Pinson, Jr., S. K. Figdor, G. M. K. Hughes, H. W. Ordway, B. M. Bloom, and G. D. Laubach

Research Laboratories, Chas. Pfizer and Co. Inc., Groton (Conn.), April 15, 1960.

Zusammenfassung

Die Darstellung der beiden epimeren C_{21}-Methylderivate des 9α-Fluorprednisolons wird beschrieben. 9α-Fluor-21-methyl-1,4-pregnadien-11β,17α,21B-triol-3,20-dion-21-azetat ist ein hochwirksames entzündungshemmendes Steroid, vollkommen frei von Nebenwirkungen der Natrium- und Wasserretention des C_{21}-unsubstituierten 9α-Fluorprednisolons.

Phenol-Mineral Interactions: The Oxidation of Pyrogallol and Other *o*-Diphenols on Silica Gel[1]

Recently, Hess, Bach, and Deuel discussed evidence for the formation of complexes between *o*-diphenols and various Si-O-Si-compounds, offering them as models for the interactions leading to soil organo-mineral substances[2]. Experimentally, they demonstrated the dissolution of silicagel, alumina, and other minerals in ammoniacal catechol with the formation of crystallizable complexes or compounds. Their highly significant experiments were carried out under comparatively vigorous temperature conditions. It may also be of significance that phenol-mineral interactions take place under mild conditions. Thus, the enzymic oxidation of eugenol to lignin-like polymers is enhanced by highly ordered minerals such as the Amphiboles and Serpentines[3]. Even in the absence of enzyme, chrysotile, hornblende, and muscovite can catalyze (at 25°C) the oxidative polymerization of eugenol to water-insoluble substances which can be eluted from the mineral surface with organic solvents[4].

In the presence of chrysotile, granite or hornblende, the oxidation of catechol at ordinary temperatures led to formation of NaCl-precipitable polymers in 23–32% yield. In their absence, one-tenth as much polymer was formed. The products formed in the presence of different minerals were distinguished by spectroscopic and chemical analysis.

Chrysotile, granite and garnet catalyzed ring hydroxylation and oxidation in phenylalamine at 60°C in the presence of H_2O_2.

In other experiments, glass fibres have been shown to catalyze pyrogallol oxidation in ethanolic solution[5].

Although these systems were set up as models for surface-catalyzed phenol oxidations and differ in approach from the work reported by Hess, Bach, and Deuel, they may be of value in revealing other aspects of the phenol-mineral interaction.

Experimental. Silicagel[6] was washed three times with hot 10% HCl (1 l/g of gel), soaked in deionized water for 6 h and rinsed in running, de-ionized water for 1 h. The washed product contained no spectrophotometrically detectable impurities, and gave negative tests for Fe (III) and Cu (II).

When M/10 pyrogallol in water or ethanol was poured over a column of washed silicagel, a yellow-brown product formed on the gel surface in less than 1 sec. The product continued to darken on the gel surface and in the supernatant for an additional 10–20 min. The adsorbed pigment was difficultly soluble in alcohol, incompletely soluble in water, but soluble in 10% HCl.

The effect of small quantities of silicagel was followed by photometric determination of oxidation product at 425 mμ. In 50 ml of M/10 KH_2PO_4, 5 *mM* of pyrogallol were dissolved and silicagel added in varying amounts. After they were shaken at 25°C for 1 h, the absorbancies of supernatants and HCl-eluates were determined. The following activity was observed for a 50-mesh gel which had been dried to constant weight over P_2O_5 at 35°C before use:

Silicagel (mg)	Absorbancy at 425 mμ		
	Supernatant	Gel	Total (as%)
0	0·062	—	100
60	0·067	0·019	139
120	0·073	0·021	150
300	0·083	0·056	224
600	0·092	0·085	287

In ethanol, pyrogallol autoxidizes at one-twentieth the rate observed in aqueous media, and the addition of 600 mg silicagel to 5 *mM* of pyrogallol in 50 ml 95% ethanol increased the rate of oxidation 30-fold.

Silica gel is also active in chloroform where pyrogallol autoxidation is nil. Even air-dry silica gel mixed with pyrogallol powder develops a black surface deposit during several weeks at 25°C.

When the gel is heated for 30 min at 500°C, its catalytic activity is lost. Similarly, fine β-quartz powder had no activity at all.

In addition to the commercial product, gels were prepared from sodium metasilicate and tetraethyl orthosilicate $(C_2H_5O)_4$ Si, using HCl or acetic acid. When M/10 HF was used, the gel formed from ethyl orthosilicate was virtually inactive.

The oxidation products formed under aqueous conditions were somewhat variable in composition, but yielded C 48–55%, H 1–2%, and ash 1–2%. These products gave no definite melting point, were lightened somewhat in color by reducing agents, and reacted vigorously with bleaching on addition of peracetic acid. Their ultraviolet absorption characteristics resemble closely those described for catechol polymers formed in the presence of mineral surfaces[4].

Other phenols were also tested as silicagel substrates. Phenol, hydroquinone resorcinol, caffeic acid and chlorophenols were not oxidized, whereas the *o*-diphenols catechol, gallic acid, and dihydroxyphenylalanine (DOPA)

[1] Most of this work was carried out at the University of Rochester with the support of Grant C-2730, National Cancer Institute, U. S. Public Health Service.

[2] R. Hess, R. Bach, and H. Deuel, Exper. *16*, 38 (1960).

[3] S. Siegel, J. Amer. chem. Soc. *79*, 1628 (1957).

[4] S. Siegel, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. *43*, 811 (1957).

[5] S. Siegel, F. Porto, and P. Frost, Arch. Biochem. Biophys. *82*, 330 (1959).

[6] Fisher Scientific Co. Silica gels, up to 200 mesh (gas chromatography grade). The ethyl silicate used was a Fisher purified grade, and sodium metasilicate was a certified reagent grade.

[7] The work of Ziechman and Kroll cited in [2]. – F. Scheffer and W. Kroll, Agrochimica *4*, 97 (1960).

like pyrogallol were converted into brown or red-brown products rapidly.

The catalytic activity of the gel was markedly reduced by 0·01–01 m Al(III), Ca(II) and Mg(II). Hydroquinone, resorcinol, and halgenated monophenols also inhibited pyrogallol oxidation on the gel. Methylene blue which is strongly adsorbed by silicagel also seemed inhibitory whereas eosin which has little affinity for silicagel also failed to suppress its catalytic activity.

Discussion. The experiments which have been described demonstrate the silicagel activated oxidation of *o*-diphenols. Accordingly, they provide evidence for the formation of complexes between silicagel and these phenols, as do earlier investigations cited.

The importance of hydrogel structure and surface charge, in catalysis are indicated by heat inactivation, the inactivity of β-quartz, and the inhibitory effects of cations. Phenolic inhibitors suggest that hydrogen bonding may also be one of the significant interactions between substrate and catalyst.

The specificity of silicagel activation (as distinct from adsorption alone) for *o*-diphenols parallels the silicate-coordinating properties of these compounds. In both systems catechol, pyrogallol and gallic acid were active, whereas phenol, hydroquinone, and resorcinol were not. Although some inorganic material is carried into solution the conditions described in this report clearly do not favor complete or extensive silicon-oxygen bond scission. Nevertheless it is likely that catalysis involves the coordination of *o*-diphenols at the silicagel surface. The oxidation products are in part firmly adsorbed on the gel, but are released by acid, perhaps by decomposition of surface complexes.

These findings support the phenol-mineral interactions and mineral-catalyzed phenol oxidations[7], which have been proposed as factors in the formation of humic substances in soil.

S. M. Siegel

Union Carbide Research Institute, White Plains (N. Y.), May 30, 1960.

Zusammenfassung

Die Oxydation von Pyrogallol, Brenzkatechin, Gallussäure und Dopa wird von Silikagel, nicht jedoch von β-Quarz, katalysiert. Diese Katalyse erfolgt nicht nur in Wasser, sondern auch in wässerigem Alkohol und Chloroform. Dabei scheinen die elektronegativen Oberflächen des Silikagels von Bedeutung zu sein. Mg^{2}, Ca^{2+} und Al^{3+} sowie verschiedene Phenole, die keine *o*-Dihydroxygruppierung besitzen, hemmen die katalytische Oxydation.

Von den geprüften Phenolen sind nur bei *o*-Diphenolen Komplexbildung mit Si^{4+} und katalytische Oxydation durch Silikagel festzustellen.

Die Bedeutung von Phenol-Mineral-Komplexen bei der Bildung von Humusstoffen wird durch die vorliegenden Untersuchungen gestützt.

A Differential Staining Reaction Demonstrating Reciprocal Activity in Mauthner's Cells[1]

In an attempt to relate the structure of the neuron with its function, extensive neurohistological and neurophysiological studies are being made on the bilaterally represented Mauthner's cells which lie in the floor of the medulla oblongata of teleosts. It was proposed[2,3], that these 2 cells function as reciprocating units so that while one cell is actively excited the other is actively inhibited. This functional relationship fulfills the requirements of a system demonstrating reciprocal inhibition of motor neurons by the sensory afferents.

It was also noted[2] that in some histological preparations of the Mauthner's cells of the bullhead there was a differential staining of the various parts of these neurons (dendrites, cell body, and axon hillock region). It was suggested that this staining reaction might be indicative of specific intracellular changes characterizing neuronal excitation as well as inhibition.

This report is concerned with a further attempt to determine the effects of controlled stimulation of the VIIIth nerve afferents on the staining reaction of the paired Mauthner's cells of the bullhead.

Materials and Methods. Fifteen bullheads (10 experimental and 5 controls) were used. Under hypothermic anesthesia, craniotomy exposed the VIIIth nerve roots and facilitated rapid removal of the brain for processing by freeze-dehydration. In the experimental fish the entering roots of the VIIIth nerve were stimulated at threshold level (1 sec at 10/sec). This was done on the right side of 5 fish and on the left side of the other 5. The brain was removed immediately and processed. The same procedure was followed on the 5 control specimens except that no stimulus was applied to the nerve roots.

Tissues frozen in Isopentane (−100°C) are dehydrated for 7 h in vacuum apparatus at pressure of not more than 1·0 μ and temperature −40°C. Dehydrated tissues embedded in paraffin are sectioned serially and mounted on glass slides. Staining is similar to the classical Bodian protargol technique[4] except reduction is carried out using the Pearson-O'Neill silver gelatin[5]. Deparaffinized sections, after hydration in 3 changes distilled water, 2 min each, are placed in freshly prepared 0·5% aqueous protargol with a 2 × 2 inch copper plate in the glass container. Incubate in 37°C oven 18–24 h. Wash 10 min in running water, 2 changes of distilled water, 5 min each, and one change of buffered[6] water for 2 min. Reduce in silver gelatin[7] mixture for 30 sec. Wash in 4 changes of distilled water, 5 min each. Tone in 0·2% gold chloride 2 min. Wash in 2 changes distilled water, 5 min each. Place in 2% oxalic acid for 15 sec, wash in 2 changes distilled water, 5 min each, and finally treat in 5% sodium thiosulfate, 2 changes, 5 min each. Wash in running water for 5 min, dehydrate and cover.

Results. The typical staining reaction of the Mauthner's cell on the same side as the applied VIIIth nerve stimulus is characterized by dendrites and perikaryon which are colored a deep purple while the axon hillock and the proximal part of the axon is an almost translucent lavender (Fig. 1). In contrast, the Mauthner's cell contralateral to the applied stimulus stains in a reverse manner with the dendrites and cell body colored lavender and the axonal

[1] Supported in part by the NIH Grants MY-3271 and H-3084.

[2] E. Retzlaff, J. comp. Neur. *101*, 407 (1954).

[3] E. Retzlaff, J. comp. Neur. *107*, 209 (1957).

[4] D. Bodian, J. comp. Neur. *68*, 117 (1937).

[5] A. Pearson and S. L. O'Neill, Anat. Rec. *95*, 297 (1946).

[6] Buffered water is prepared as follows: 17 ml of 5 *M* acetic acid (12 ml to 1000 ml distilled water) added to 3 ml of sodium acetate (16 g to 1000 ml distilled water). Buffered water prepared by adding 14 ml of stock buffer to 1000 ml distilled water. The pH is approximately 4.1.

[7] The silver gelatin reducing solution, using buffered water, is prepared as follows: (1) 400 ml 3% gelatin heated to 70°C; (2) 100 ml 2% $AgNO_3$; (3) 40 ml 1% hydroquinone. Stir (2) and (3) together and add to (1) immediately before reducing sections.

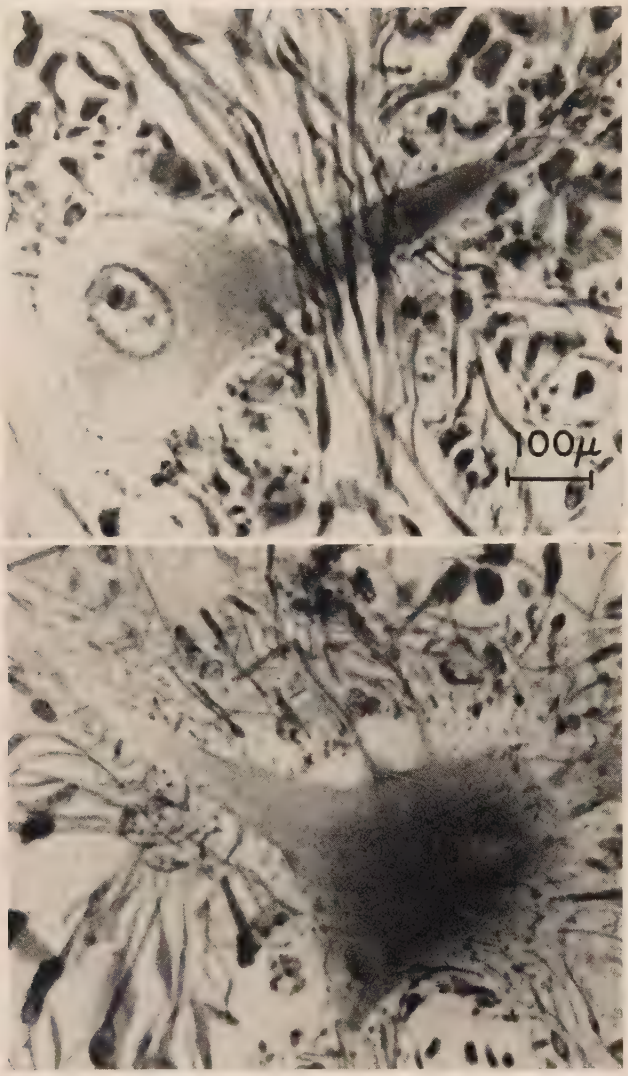


Fig. 1. Photomicrograph of bilaterally represented Mauthner's cells, showing effects of unilateral stimulation of VIIIth nerve root. Cell on the side of the applied stimulus (upper) shows deeply stained dendrites and cell body and a lightly colored axonal region. Dendrites and cell body of the cell contralateral to the applied stimulus stain a light color while axonal area is colored a deep purple. Axon of each cell is directed toward the center and somewhat upward.

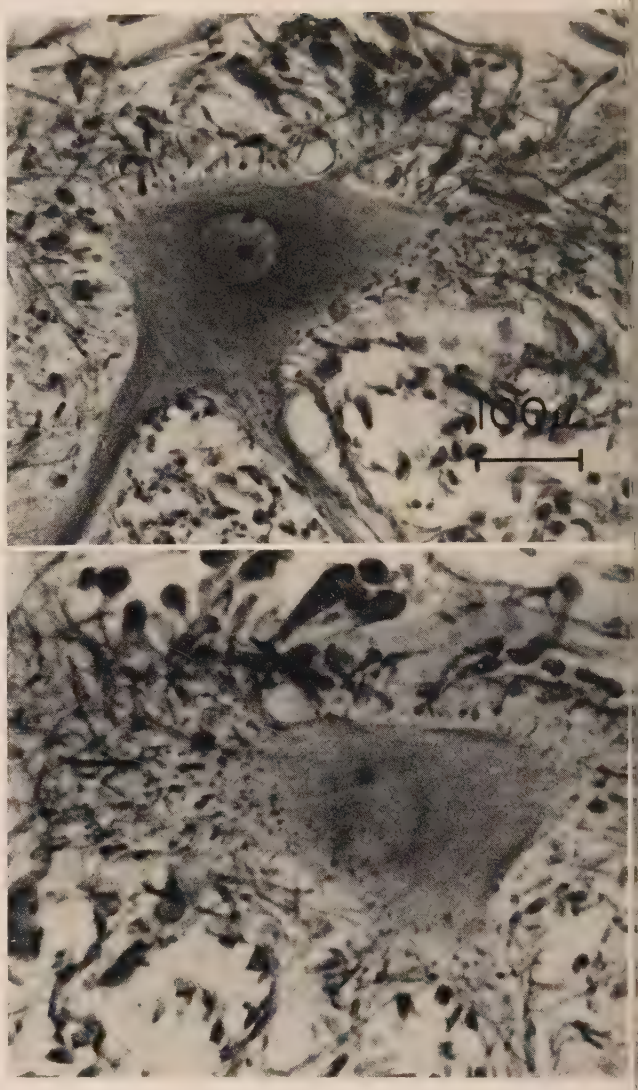


Fig. 2. Photomicrograph of Mauthner's cells in control bullhead. Note uniformity of staining reaction of dendrites, cell body, and axonal region in contrast to staining in the experimental fish. Orientation is the same as in Fig. 1.

pole of the cell a deep purple. Both of the Mauthner's cells in the non-stimulated fish have a rather homogenous lavender coloration (Fig. 2). In all specimens, both experimental and controls, the neuronal elements such as the nucleus appear essentially normal. The several types of boutons terminaux which literally cover these cells are a deep purple color with no indication of any differential staining either in the experimental or control bullheads.

Discussion and Conclusions. VIIIth nerve afferent fibers make synaptic contact with specific parts of the paired Mauthner's cells. There are unbranched VIIIth nerve afferents which end exclusively on the distal part of the lateral dendrite and those which cross the midline to end on the axon pole of the contralateral neuron. Other VIIIth nerve afferents branch in such a way that their synaptic boutons contact the proximal part of the lateral dendrite and the perikaryon of the homolateral cell after which they continue to the opposite side where they end on the axon hillock of the contralateral Mauthner's cell. These two giant neurons are connected by axon collaterals which arise from the axon of one Mauthner's cell and terminate on the axon hillock of the other cell[8].

These structural relationships support the concept of polar function of the neuron[2,3,9]. According to this hypothesis, the afferent fiber terminal boutons on the dendrites and cell body function to excite the neuron, while those on the axon hillock and the proximal part of the axon are inhibitory to neuronal discharge. Thus, the effect of unilateral VIIIth nerve root stimulation would be to excite the homolateral Mauthner's cell. The axo-axonal collaterals then could act as a delaying feed-back loop which would augment the inhibitory effect on the already inhibited neuron.

[8] E. Retzlaff and Joan Fontaine, Science *131*, 104 (1960).
[9] R. Gesell, Ergebn. Physiol. *43*, 477 (1940).
[10] G. J. Romanes, J. Anat. *84*, 104 (1950).
[11] Special attention is called to *Neuronal Dye-Sorption as a Histochemical Indicator of Nervous Activity* by R. Fischer and W. Zeman, Nature *183*, 1337 (1959).

Unilateral VIIIth nerve stimulation excites only the homolateral Mauthner's cell[3]. Bilateral simultaneous stimulation of the VIIIth nerve does not induce both Mauthner's cells to discharge at the same instant, as indicated by evoked potentials recorded from the Mauthner's axons in the spinal cord[3]. This supports the concept that these two motor neurons are reciprocally affected by VIIIth nerve stimulation. This phenomenon has been designated as simultaneous excitation of one neuron and inhibition of the other by afferent nerve stimulation.

The differential staining reaction suggests an intracellular chemical correlation with functional neuronal excitation and inhibition. The synaptic effect on these two cells may alter the intracellular Cl^- ion concentration in various parts of the neuron, which, in turn, determines the staining reaction of neurons by reduced silver[8,10]. Also, it may be that redox potential changes occur which cause the difference in silver deposition.

Inasmuch as the staining reaction of the two Mauthner's cells is altered by selective stimulation, it is postulated that the dendrites, the cell body, and the axon hillock region are of prime functional importance in nervous integration. The various synaptic endings which display a homogenous staining reaction may serve as activators for the intracellular activity rather than specific excitors or inhibitors[11].

E. Retzlaff and Joan Fontaine

Research Division, Columbus Psychiatric Institute, Ohio State University, Columbus (Ohio), March 29, 1960.

Zusammenfassung

Die Mautnerzellen des Welses (*Ameirus*) zeigen nach Reizung des N. statoacusticus ein färberisches Verhalten, das erlaubt, sie von ungereizten Zellen mit Sicherheit zu unterscheiden.

Quantitativer Nachweis eines Abbaus von Zellulose und Lignin in der rollkranken Rebe

Im vergangenen Jahr wurde mitgeteilt, dass ein spezielles Virus die weitverbreitete Rollkrankheit der Rebe verursacht[1]. Sekundär bewirkt es, dass die rollkranke Vitis Zellulose und Lignin anomal abbaut, wodurch die unverkennbaren Symptome (eingerollte Blätter und durchhängende Triebe) entstehen. Als spezifisches intermediäres Stoffwechselprodukt konnte ich 4-Methyl-D-glukuronsäure (4-M-D-g)[2] erfassen. Diese irreguläre Verbindung kommt in gesunden oder anders infizierten Weinstöcken nicht vor.

Bei schwer rollkranken Pflanzen fiel auf, dass der native Gehalt an Zellulose bei pathologisch gezeichneten Blättern und weichen Trieben auf 0,3% des normalen herabgesunken und Lignin vollkommen verschwunden war. Bei diesen stark zurückgefallenen Reben ergab die partielle Analyse der Kohlehydrate von den grünen Sprossorganen zu 54,7% 4-M-D-g. Leichter kranke, noch fast symptomlose Stöcke enthielten 22% Zellulose, 13% Lignin und 26,3% 4-M-D-g.

Da dieser charakteristische Zerfall der natürlichen Gerüstsubstanz offensichtlich mit dem progressiven Grad der Infektion fortschreitet, versuchte ich ausserdem, den eigentümlichen Metabolismus exakter stufenweise experimentell festzuhalten. Dazu wurden zehn einwandfreie Edelreiser gleichzeitig auf zehn rollkranke Unterlagen gepfropft. Ab 15. Tag nach ausgeführter Kopulation wurde in regelmässigen Abständen von sieben Tagen von den angesteckten, latent kranken Edelreisern je ein äusserlich unverändertes Blatt abgeschnitten und die drei fraglichen Inhaltsstoffe quantitativ chromatographisch bestimmt. Die Einzelergebnisse wurden einer Varianzanalyse nach Fisher und Yates[3] unterworfen. Der mittlere Fehler beträgt $\pm$ 3%. Die Mittelwerte sind mit $P < 0{,}1$ gesichert. Die in der Tabelle zusammengestellten Daten bestätigen, dass mit zunehmender Dauer des virösen Befalls die pflanzlichen Festigungselemente schrittweise reduziert werden und damit verbunden 4-M-D-g kontinuierlich ansteigt.

Tage nach der Inokulation	Gehalt an Zellulose in % der gesunden Kontrolle (= 100)	Gehalt an Lignin in % der gesunden Kontrolle (= 100)	Gehalt an 4-M-D-g in % der gesunden Kontrolle (= 0)
15	90,5	83,4	0,3
22	84,2	80,2	0,48
29	80,7	78,8	0,62
36	76,3	77,5	0,85
41	74,6	75,2	1,4
48	73,4	74,5	1,8
Leichtkranke Reben ohne Symptome. Infektionsdatum unbekannt	22	13	26,3
Schwerkranke Reben mit Symptomen. Infektionsdatum unbekannt	0,3	0	54,7

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanzierte die Untersuchungen, wofür bestens gedankt sei.

Gertrud Ochs

Botanisches Institut der Universität Freiburg (Breisgau), 5. April 1960.

Summary

In leafroll-diseased grapevines, lignine and cellulose decompose anomalously. Therefore leaves and shoots of these vines curl characteristically down and inward. As a specific intermediate product, 4-methyl-D-glucuronic acid has been identified. The decomposition increases proportionally to the progress of the infection.

[1] Gertrud Ochs, Exper. *15*, 303 (1959).

[2] B. Flaschenträger, *Lehrbuch der physiologischen Chemie* (Springer, Berlin 1951), p. 308.

[3] R. A. Fischer und F. Yates, *Statistical Tables* (Oliver & Boyd, London 1949).

Aspetti del nucleolo di cellule normali e patologiche[1]

Nel nucleolo unico degli ovociti di alcune specie di Molluschi (*Aplysia depilans, Mytilus galloprovincialis*) e di Echinodermi (*Paracentrotus lividus, Arbacia lixula*) è stato possibile rilevare che, durante il corso dell'accrescimento ovocitario, in relazione alla rarefazione delle ribonucleoproteine, ed al passaggio da uno stato più denso ad uno meno denso delle sostanze nucleolari, si rendono manifesti

[1] Ricerche effettuate con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche Italiano.

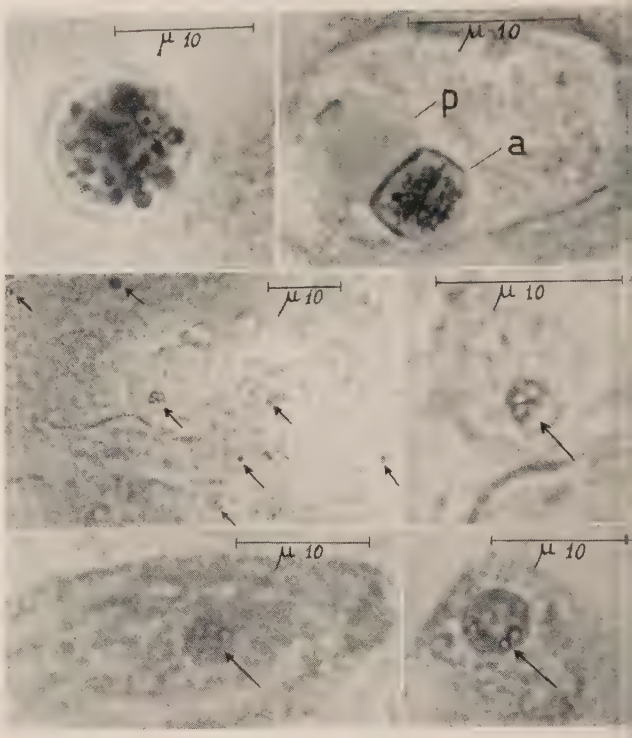
dei granuli nucleolonemali (Fig. 1), i quali di solito sono fra di loro collegati da sottili filamenti[2]. Tali granuli, già visibili negli ovociti allo stato vitale, si pongono bene in evidenza nei preparati allestiti secondo una particolare tecnica di impregnazione con cloruro di platino[3]. Essi appaiono molto rifrangenti, e dotati di un caratteristico colore rosso-granato, che vira al giallo col variare dell'angolo di incidenza della luce; a nicols incrociati risultano divisi da una croce nera di interferenza in quattro quadranti molto luminosi; non presentano birifrangenza. Gli stessi granuli poi risaltano sulla *pars amorpha* del nucleolo, la quale appare dotata di una caratteristica colorazione verde-smeraldo. Il passaggio delle sostanze nucleolari da uno stato più denso ad uno meno denso viene interpretato in base alle colorazioni assunte col metodo Mallory; infatti, la rossofilia è l'indice probabile di uno stato di maggiore densità, l'azzurrofilia di uno stato di minore densità[4]. La varia concentrazione delle ribonucleoproteine è stata apprezzata con la colorazione Unna-Pappenheim, e con quella di Einarson, entrambe a pH opportuno e con controllo mediante ribonucleasi.

Le condizioni principali, che si realizzano negli ovociti presi in esame, sono le seguenti: nella previtellogenesi nucleoli rossofili, con notevole quantità di ribonucleoproteine, e con granuli assenti o piuttosto scarsi; nella vitellogenesi nucleoli azzurrofili, con poche ribonucleoproteine, e con granuli in numero più o meno abbondante. Fra tali condizioni esiste tutta una serie di stadi intermedi. Alla fine dell'accrescimento degli ovociti i nucleoli vanno in disfacimento; è possibile notare che la sostanza azzurrofila si diffonde nel cariolasma; i granuli si disgregano per dar luogo ad una sostanza apparentemente omogenea.

Le ricerche effettuate poi specialmente su ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster*, su fegato, pancreas esocrino, tessuto nervoso centrale di varie specie di Vertebrati (*Diplodus annularis, Bufo vulgaris, Discoglossus pictus, Lacerta muralis, Fringilla serinus, Columba livia, Epimys rattus*), sui meristemi degli apici radicali di due piante (*Allium cepa, Vicia faba*) hanno permesso di riscontrare che in tali organi e tessuti si hanno, per quanto in maniera non frequente, le tre condizioni già rilevate negli ovociti, e cioè passaggio dalla rossofilia all'azzurrofilia (non sempre ben netta), rarefazione delle ribonucleoproteine, presenza di granuli nucleolonemali (Fig. 5 e 6).

Nei nucleoli delle cellule dei tumori esaminati (carcinoma della mammella di donna, linfogranuloma maligno umano, tumore di Walker del ratto) le tre suddette condizioni si osservano in maniera molto più frequente (Fig. 3) che nei tessuti normali. L'azzurrofilia, che i suddetti nucleoli manifestano, è di solito molto marcata; in relazione ad essa le ribonucleoproteine appaiono quasi del tutto assenti, ed i granuli nucleolonemali possono essere in numero anche cospicuo (Fig. 4).

Va rilevato ancora che i granuli nucleolonemali in tutti i tessuti considerati, normali e patologici, di animali e di vegetali, col metodo di impregnazione platinica appaiono sempre con le stesse caratteristiche fisiche già in precedenza riportate per i nucleoli degli ovociti. Nei tumori in particolare tali granuli erano stati già osservati da Page, Regan e MacCarty[5], autori che, in merito ad essi, si erano pronunziati nel seguente modo: «We do not know the nature of these structures or their significance. It may be that they are concerned with the altered metabolism of rapidly growing cells of malignant tumors. They may be of some value in the differentiation of normal and malignant cells». Sul passaggio di stato poi delle sostanze degli inclusi nucleari (nucleoli) dei tumori, si erano in precedenza anche pronunziati altri autori, quali Pecchiai e d'Ancona[6].



(Da sinistra a destra)

Fig. 1. Nucleolo di ovocita vitellogenetico di *Paracentrotus lividus* con numerosi granuli nucleolonemali. – Fig. 2. Nucleolo primario privo di granuli (*p*) ed anfinucleolo con molti granuli (*a*) di ovocita vitellogenetico di *Patella coerulea*. – Fig. 3. Porzione di tumore di Walker con numerosi nucleoli con granuli (frecce). – Fig. 4. Particolare della figura 3, in cui si rilevano i granuli (freccia) a più forte ingrandimento. – Fig. 5. Nucleolo con granuli (freccia) di neurone del midollo spinale di *Discoglossus pictus*. – Fig. 6. Nucleolo con granuli (freccia) di cellula meristematica dell'apice radicale di *Vicia faba*.

Tenuto presente che le manifestazioni di azzurrofilia e di perdita delle ribonucleoproteine con relativa comparsa di un numero notevole di granuli hanno luogo nei nucleoli degli ovociti nell'ultimo periodo (terzo) del loro accrescimento, che nei vari tessuti normali le stesse manifestazioni non sono frequenti, e che infine nei tumori, come negli ovociti, sono molto frequenti, si può pensare che esse costituiscano l'indice di fenomeni di decadenza. Contro tale veduta sta però quanto è stato osservato negli ovociti in accrescimento di *Patella coerulea*, nei quali è possibile rilevare l'esistenza di due tipi distinti di nucleolo, e cioè del nucleolo primario, che ha un elevato metabolismo ribonucleoproteico, e degli anfinucleoli adulti, che non posseggono ribonucleoproteine[2,7,8]. Altre differenze notevoli esistono fra tali due tipi; infatti, mentre il

[2] A. Bolognari, Arch. Zool. ital. *44*, 53 (1959).

[3] A. Bolognari, M. Albanese e A. Donato, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *35*, 764 (1959).

[4] A. Bolognari, Acta histochem. *2*, 229 (1956).

[5] R. C. Page, J. F. Regan e W. C. MacCarty, Amer. J. Cancer *32*, 383 (1938).

[6] L. Pecchiai e S. D'Ancona, R. C. Ist. lomb. Sci. Lett., Cl. Sci. *92*, 424 (1958).

[7] A. Bolognari, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *34*, 245 (1958).

[8] A. Bolognari, Boll. Soc. ital. sper. *35*, 37 (1959).

[9] A. Bolognari, Acta histochem. *8*, 504 (1959).

[10] A. Bolognari, Atti Soc. Pelor. Sci. fis. mat. nat., Messina *4*, 367 (1957–58).

[11] A. Bolognari, Nature *183*, 1136 (1959).

nucleolo primario, che rimane piuttosto distanziato dalla membrana nucleare, si manifesta sempre rossofilo e privo di elementi nucleolonemali (Fig. 2), gli anfinucleoli, che contro la membrana nucleare vanno infine ad aderire strettamente, si dimostrano azzurrofili e con elementi nucleolonemali più o meno complessi (Fig. 2). Ulteriori esami citochimici[9] hanno permesso di individuare ancora nel nucleolo primario un complesso ribonucleoproteico con gruppi sulfidrilici, e negli anfinucleoli un complesso lipoglicoproteico con gli stessi gruppi. Entrambi i complessi sembrano regolati da una attività fosfatasica. Per i granuli nucleolonemali si è rinvenuto un complesso molto generico di glicoproteine, complesso nel quale, oltre ad essere assente l'acido ribonucleico, sembrano mancanti anche i lipidi, i gruppi sulfidrilici e l'attività fosfatasica. Tali diversità di costituzione chimica trovano il loro più convincente fondamento nei caratteri ultrastrutturali rilevati al microscopio elettronico[10,11].

I dati ricavati specialmente dagli ovociti di *Patella*, portano ad individuare nel nucleolo almeno due funzionalità principali, delle quali una legata essenzialmente alle ribonucleoproteine, e l'altra legata a sostanze non ancora bene identificate, ma comunque connesse con la presenza degli elementi nucleolonemali. Le manifestazioni relative alla seconda funzionalità si riscontrano con frequenza molto notevole tanto negli ovociti in accrescimento, che nelle cellule dei tumori, cioè dove si hanno le forme di metabolismo più esaltate. Non è improbabile che l'accostamento fra le attività nucleolari degli ovociti e quelle dei tumori possa portare in seguito ad una delucidazione sugli intimi meccanismi fisico-chimici intracellulari, che costituiscono il fondamento dell'insorgenza e del decorso delle cellule degli stessi tumori. Le nuove prospettive aperte dalla citofisicochimica, integrata dai dati forniti dalla microscopia elettronica, potranno essere di giovamento in tal senso.

A. Bolognari

Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata dell'Università di Messina, il 6 gennaio 1960.

Summary

On the basis of research carried out on various animal and plant tissues, both normal and pathologic, the author reaches the conclusion that two chief functions can be attributed to the nucleolus. One of them is related to the ribonucleoproteins, the other to less well known substances which are probably connected with nucleolonemal elements. It is also suggested that the second function seems to be a characteristic of cells with high metabolic activities, such as growing oocytes and tumor cells.

Maintenance of Visual Cells in vitro[1]

The chemical reaction of the rhodopsin cycle has mainly been analysed by means of a rhodopsin solution which is extractable with detergents, particularly digitonin, from the whole retina or from the isolated outer segments of the visual cells[2,3]. Recently, Arden[4] measured the absorption spectrum of visual pigment in suspensions of intact rod outer segments from the frog's retina. In such a suspension the shifts of the absorption maximum toward the longer wave length compared to that of the extracted visual pigment was observed by Barer and Sidman[5], Wald and Brown[6], and by Sidman[7]. It is of interest to study the biochemical changes of the visual pigments of a single living photoreceptor cell following stimulation. This paper is concerned with a preliminary observation on the maintenance of single visual cells in tissue culture.

Retinae excised from dark-adapted frogs, *Rana pipiens*, were cut into small pieces on a cover glass which served as the bottom wall of a Rose chamber in order to keep all fragments of outer segments of the visual cells. The explants were cultivated under dialysis membranes in Rose chambers[8]. The fluid nutrient used was composed of 50% amphibian Tyrode, 45% human ascitic fluid, and of 5% chick embryonic extract, reinforced with glucose at a final concentration of 300 mg%. These Rose chambers were kept in darkness at room temperature.

A large number of the rod outer segments with or without ellipsoids, and single visual cells equipped with both inner and outer segments and a nucleus were also studied under cellophane covering the entire culture area. Some of the isolated rod outer segments were found to lose their cylindrical structure within about 1 h after they were set up in Rose chambers. During the first 18 h the complete outer segments were present and showed refractivity and their usual smooth sheath. After the 2nd day most of the outer segments began to rupture. Such a morphological change of the rod outer segments might be caused by damage to their rod sheaths during the course of cutting the retinae. After the 7th day it was observed that most of the outer segments, which had undergone degeneration, assumed round or oval shapes, and others were transformed into elongated structures, as indicated in Figure a and b. On the other hand, even after the 20th day, the refractivity and smooth sheath of the outer segments were well maintained in isolated single photoreceptor cells as well as in that of the retinal explants which kept their complete structure even after being cultured for one month. Epithelial outgrowth from explants was observed after 14 days of cultivation. However, the rate of outgrowth was not as high as that observed in embryonic chick retinae.

The presence of rhodopsin as indicated by the red tint was observed both in the isolated photoreceptor cell as well as in the cell clusters of explanted retinal fragments. Rhodopsin regenerated readily when Rose chambers were kept in darkness. The color intensity of rhodopsin, however, decreased after explantation and was weaker than in freshly excised retinae from dark-adapted frogs. No indication of the presence of rhodopsin was observed in the elongated outer segments, while it was demonstrable in the rounded outer segments after the 14th day. Autofluorescence indicating the presence of vitamin A was noticed in the rounded outer segments in which rhodopsin was diminished. When the Rose chambers were kept in the refrigerator, both the structure and rhodopsin in the outer segments of photoreceptor cells were preserved in contrast to those kept at room temperature.

It might be possible to study the mechanism of the rhodopsin cycle in a single photoreceptor cell and to in-

[1] Aided by a grant from the National Society for the Prevention of Blindness.

[2] H. J. A. Dartnall, *The Visual Pigments* (John Wiley & Sons, Inc., New York 1957).

[3] G. Wald, Ann. Rev. Biochem. *22*, 497 (1953).

[4] G. B. Arden, J. Physiol. *123*, 377, 386 (1954).

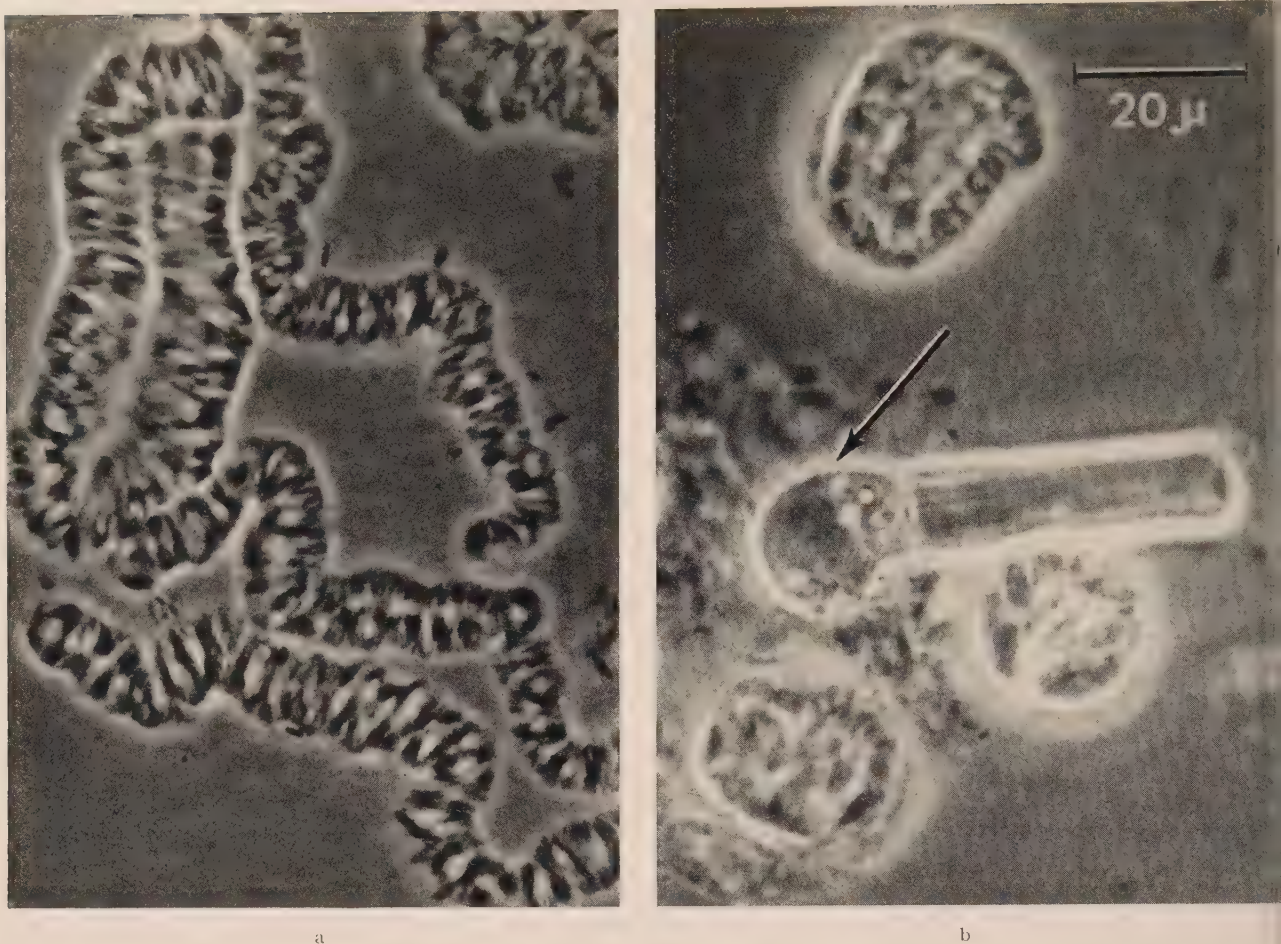
[5] R. Barer and R. L. Sidman, J. Physiol. *129*, 60P (1955).

[6] G. Wald and P. K. Brown, Science *127*, 222 (1958).

[7] R. L. Sidman, Ann. N. Y. Acad. Sci. *74*, 182 (1958).

[8] G. G. Rose, C. M. Pomerat, T. O. Shindler, and J. B. Trunnell, J. Biophys. Biochem. Cytol. *4*, 761 (1958).

[9] Research fellow of the National Society for the Prevention of Blindness administered by Dr. G. Robertson.



a b

a and b. Photomicrographs showing the rod outer segments from a frog's retina.

a) Elongated rod outer segments indicating the band-like structure which resulted from the loose separation of discs in the rod outer segment. b) Round-shaped rod outer segments and a single rod cell in which a smooth sheath of the outer segment and a nucleus (indicated by an arrow) are seen. The length of the inner segments of the single rod cell appeared to be relatively short. Photomicrographs were taken from a 16-day culture.

vestigate whether there are action potentials in relation to light stimuli. Further microspectrophotometric measurements on visual pigments in the single photoreceptor cell are being carried out.

Acknowledgement. The author acknowledges his sincere gratitude to Professor C. M. Pomerat for valuable suggestions and encouragement.

Masao Yoshida[9]

Tissue Culture Laboratory, Department of Anatomy, The University of Texas, Medical Branch, Galveston (Texas), March 10, 1960.

Résumé

Des fragments de rétine et des cellules visuelles isolées de la grenouille *Rana pipiens* ont été cultivés dans la chambre de Rose. Bien qu'une dégénérescence morphologique des segments extérieurs des cellules visuelles ait été observée pendant la culture, le pouvoir de réfraction normal et la présence du pigment visuel ont été constatés dans ces segments, les segments intérieurs avec leurs noyaux étant conservés. Mais, l'intensité du pigment visuel a été plus faible que dans la rétine fraîche. Ces résultats montrent que la cellule individuelle du photorécepteur se prête à l'étude physiologique *in vitro*.

Genetic Nature of Self-Incompatibility in Annual Chrysanthemum

Studies on the genetics of self-incompatibility in various plants have proved to be of considerable interest for several aspects of gene action. An important discovery in recent years has been that in some members of the family compositae, the imcompatibility alleles show a sporophytic determination of their behaviour in one parent and gametophytic in the other[1,2]. Additional evidence suggesting that the incompatibility genes in this family do not conform to an easily predictable system with regard to their dominance relationships, has been presented by Crowe[3] on the basis of her observations on *Cosmos*. In view of these findings, it is of interest to undertake further investigations on the breeding systems of other members of this group. In the present brief report, evidence relating to the genetic nature of self-incompatibility in *Chrysanthemum carinatum* ($2n = 18$) is presented.

[1] D. U. Gerstel, Genetics *35*, 482 (1950).
[2] H. B. Hughes and E. B. Babcock, Genetics *35*, 570 (1950).
[3] L. K. Crowe, Heredity *8*, 1 (1954).

During the course of an experiment involving mutation studies on the variety Single Yellow of annual chrysanthemum, a large number of plants were found on selfing to be completely sterile. Seven of them which formed the progeny of a cross, attempted primarily to study the inheritance of a radiation induced character, were intercrossed in all possible combinations. Their crossibility relationships indicated four intra-sterile groups, having 2, 2, 1, and 2 plants respectively. The inter-group compatibility of these plants is indicated in the following Table.

♀ \ ♂	Group I	Group II	Group III	Group IV
Group I . . .	–	–	+	+
Group II . . .	–	–	+	+
Group III . . .	–	+	–	–
Group IV . . .	+	+	–	–

+ Compatible. – Incompatible.

The above observations show that not all the groups are inter-fertile. Groups I and II, for instance, show intersterility both ways and a similar behaviour is shown by Groups III and IV. Groups I and II also show inter-sterility but in one direction only. These features of the results obviously cannot be explained on the basis of the gametophytic determination of incompatibility genes as in *Nicotiana*. They appear however to be quite similar to those reported for other members of Compositae; and, of the two genetic mechanisms proposed for this group, the one by GERSTEL[1], and by HUGHES and BABCOCK[2] suggesting sporophytic control of pollen reaction, accounts for them.

According to the scheme put forward by GERSTEL, the multiple alleles of the gene R determine the mating system. Assuming for the two parental plants involved in the present cross, the genetic constitutions of R_1R_2 and R_3R_4, the four groups of plants expected in the progeny are R_1R_3, R_1R_4, R_2R_3, and R_2R_4 respectively. These genotypes for the four intra-sterile groups observed in the progeny are entirely consistent with their intercrossibility relationships if it is supposed that the genes show independent action in the style, and the two alleles of the male parent, on the basis of their dominance relation, determine the reaction of the pollen. From the results it is possible to deduce the dominance of R_1 over R_4 and of R_2 over both R_3 and R_4. R_1 and R_3 show no mutual interaction, in other words, they show equal dominance as is indicated by the inter-sterility of group II with I ($R_1R_4 \times R_1R_3$) and of group III with I ($R_2R_3 \times R_1R_3$). In the absence of parent progeny crosses, the interaction of R_1 with R_2 and of R_3 with R_4 could not be determined. Special techniques are being employed to achieve such crosses.

The above interpretation of the results shows that self-incompatibility in annual chrysanthemum can be explained on the basis of the scheme postulated for *Parthenium argentatum* and *Crepis foetida*, and differs from that in *Cosmos* in which dominance between alleles has been demonstrated to occur both in the pollen and the style. This would suggest that the Composite scheme developed from observations on the first two plants is probably more typical of the family.

We are grateful to Dr. B. P. PAL and Dr. A. B. JOSHI for their kind interest in this work and encouragement during its progress.

H. K. JAIN and S. B. GUPTA

Botany Division, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, September 3, 1959.

Zusammenfassung

Es werden Beweise für die sporophytische Determinierung der Selbst-Inkompatibilität von *Chrysanthemum carinatum* erbracht. Die Resultate weisen auch darauf hin, dass die Inkompatibilitäts-Allele im Pollen Dominanz zeigen, während sie im Griffel unabhängig sind. Der Inkompatibilitäts-Typus in dieser Pflanze stimmt mit jenem von *Parthenium* und *Crepis* überein, weicht aber von dem bei *Cosmos* gefundenen ab. Es wird angenommen, dass das Schema, wie es bei den erstgenannten Gattungen nachgewiesen wurde, typisch ist für die Familie der Kompositen.

The Mechanism of External Pancreatic Secretion

In the external secretion of the pancreas of dogs, the concentration of bicarbonate increases and that of chloride decreases with increasing rates of secretion[1,2]. The sum total is almost constant and the secretion is always isotonic with the extracellular fluid[2]. Experimental data are represented in Figure 1.

Since, at high rates of secretion, actual values of bicarbonate of 152 meq/l were observed, whereas in plasma the maximal bicarbonate concentration is about 30 meq/l, it seems that we are dealing in the primary, active secretion with an isotonic fluid, containing bicarbonate as the sole anion, associated chiefly with sodium[2]. This secretion is then modified as it passes through the ductal system.

The fact that with decreasing flow Cl^- concentration increases and HCO_3^- decreases, approaching blood plasma levels, may be explained by either of the following hypotheses: (a) the bicarbonate secretion of the glandular cells is mixed on its way with a plasma ultrafiltrate[3], or (b) the

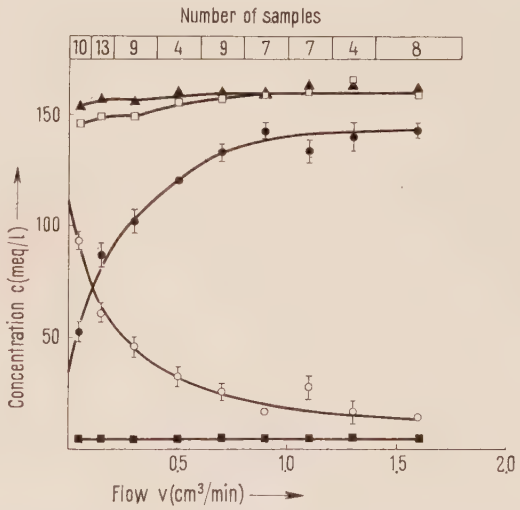


Fig. 1. Average concentration of bicarbonate (●), chloride (○), sodium (▲), potassium (■), and sum of anions (□) at various rates of external pancreatic secretion. The vertical lines show the standard deviation of the mean.

[1] F. BRO-RASMUSSEN, S. KILLMANN, and J. S. THAYSEN, Acta phys. scand. *37*, 97 (1956).

[2] A. K. SOLOMON, Fed. Proc. *11*, 722 (1952).

[3] R. K. LIM, S. M. LING, A. C. LIN, and I. C. YUAN, Chinese J. Physiol. *10*, 475 (1936). – F. HOLLANDER and D. BIRNBAUM, Trans. N. Y. Acad. Sci. *15*, 56 (1952).

secretion of the glandular cells is equilibrated by anion exchange as it passes along the ductal system.

We wish to point to some evidence which seems to exclude the first possibility and to support the second hypothesis. The relative impermeability of the ducts to cations is indicated by the fact that sodium is excreted in almost constant concentration, somewhat above its level in the extracellular fluid, and that its concentration is independent of the rate of flow (Fig. 1)[1]. Moreover it was shown, that in contrast to cations, both inorganic monovalent anions and small neutral molecules[4] and likewise acidic or some amphoteric dyes[5] appear in the pancreatic juice soon after their intravenous injection—an evidence which would suggest an anion exchange property of the ductal epithelium. This property would require that the total amount of anions, other than HCO_3^-, transported per min through the wall of the duct, is constant and independent of the flow rate. This applies, indeed, for Cl^-, the maximum output being about 16 μeq/min at flow rates higher than 0·4 ml/min (Table). However, at low rates of flow, reabsorption seems to diminish the chloride output.

Another important fact is the constancy of the ratio of concentrations of certain compounds in pancreatic juice to their concentration in plasma. This ratio was proven to be independent of flow and plasma level for the following compounds: Urea 0·8[1], glucose 0·2[1], creatinine, and inorganic phosphate[6]. If the pancreatic secretion consisted of a primary fluid containing bicarbonate and an admixed plasma filtrate, we should expect varying concentrations of the above materials as the flow changes. Otherwise, it would be necessary to assume that the primary secretion contains the above materials exactly in the same proportion in which they permeate the hypothetical filtrating membrane.

By assuming admixture of primary secretion and passive filtrate through the ductal membrane, it would be necessary to admit a changing rate of filtration corresponding to the changing rate of secretion. This would require an exact nervous or hormonal regulation of the admixing rate; otherwise it would be difficult to understand why the filtration rate should change at all at constant blood pressure. The fact that backpressure does not modify the composition of the pancreatic juice may serve as further evidence against a filtration mechanism[7].

In the light of the evidence cited it seems more probable that we are dealing with a diffusion phenomenon rather than with admixture, i. e. the primary active secretion is modified on its way out be exchange of anions through the ductal membrane.

Appendix. According to equation 5 of Bergmann and Dikstein[8,9]

$$c_x = \frac{C''}{v_x} \exp\left[-2\pi r K_T \int \frac{c_x - c_e}{c_x v_x} dx\right]$$

which for v = constant is reduced to

$$c_x = C \exp\left[-\frac{2\pi r K_T x}{v}\right] + C' , \qquad (1)$$

The boundary condition: if $K_T \to \infty$ or $v \to 0$ gives

$$C' = c_e \qquad (2)$$

and $K_T \to 0$ or $v \to \infty$ gives

$$C = c_0 - c_e . \qquad (3)$$

By substituting equations (2) and (3) into equation (1) and rearranging, we obtain

$$\ln \frac{c_x - c_e}{c_0 - c_e} = -\frac{2\pi r K_T x}{v} . \qquad (4)$$

This means that $\ln(c_x - c_e)$ versus $1/v$ should give a straight line. This is the case indeed for medium flow rates as can be seen on Figure 2. In the right hand of expression (4), magnitudes in the coefficient $2\pi r K_T x$ are identical for different solutes, with the exception of K_T. Therefore the slope of the straight lines in Figure 2 are proportional to K_T. Since the slopes are identical, $K_T^{Cl^-} = K_T^{HCO_3^-}$ which further supports our hypothesis of anion exchange.

Range of flow		Chloride output in μeq/min	
0 –0·1	0·8 –1·0	6·7 ± 0·25	15·4 ± 6·0
0·1–0·2	1·0 1·2	8·9 ± 0·5	25·0 ± 2·5[a]
0·2 –0·4	1·2 1·4	13·0 ± 0·6	13·2 ± 4·5
0·4–0·6	1·4–1·8	16·9 ± 3·2	21·3 ± 5·0
0·6–0·8		13·2 ± 3·0	

[a] According to Fig. 1, the values for Cl^- are somewhat higher and those for HCO_3^- are somewhat lower than expected, i. e. they fit for a lower rate. Thus the high value for Cl^- output in this group is presumably caused by experimental error, working in non-steady state condition.

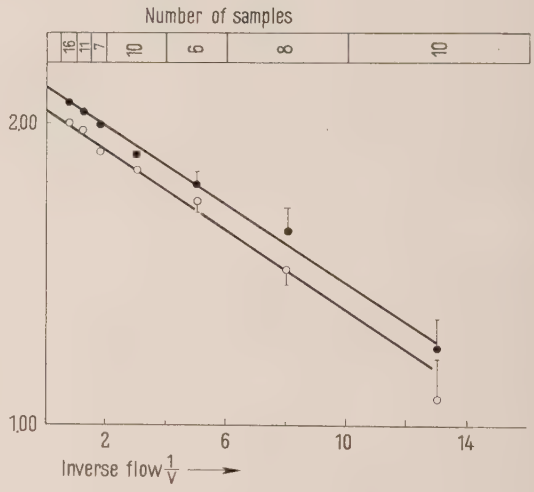


Fig. 2. Relation of the logarithm of [HCO_3 – 30] and logarithm of [110-Cl] to the reciprocal rate of secretion. The same symbols are used as in Fig. 1.

S. Dikstein and D. Birnbaum

Department of Pharmacology, The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, and Laboratory of Gastroenterological Research, Hadassah-Hebrew University Hospital, Medical School, Jerusalem (Israel), April 22, 1960.

[4] P. Dissard, G. Reynaud and J. Raffier, C. R. Soc. Biol. Paris *147*, 1414 (1953).

[5] M. B. Visscher, Fed. Proc. *1*, 246 (1942).

[6] E. Jacobs, *Livre Jubilaire Paul Govaerts* (1955), p. 577, cf. Chem. Abstr. *49*, 16118 (1955).

[7] G. L. Jordan and G. A. Hallenbeck, Amer. J. Phys. *170*, 21 (1952).

[8] F. Bergmann and S. Dikstein, J. Phys. *145*, 14 (1959).

[9] *Symbols.* c = concentration, v = flow, K_T = transfer constant, r = radius of the duct, x = length of the duct, C = constant. *Subscripts.* x = at distance x, 0 = at the origin, e = external.

Zusammenfassung

Gegenwärtig vorliegenden Daten gemäss kann der Mechanismus der äusseren Sekretion der Bauchspeicheldrüsen am besten durch die Hypothese erklärt werden, dass zuerst eine bikarbonatreiche Lösung gebildet wird, die dann auf dem Weg durch die Gänge der Bauchspeicheldrüse mit dem extrazellulären Chlorid ausgetauscht wird. Die Wände der Gänge wirken als eine anionendurchlässige Membrane.

Absorption of L-Lysine in the Small Intestine of Rats

WISEMANN[1] reported that isolated loops of rat's intestine transfer monoamino acids but not diamino acids, lysine, and ornithine, against a concentration gradient. Since L-lysine is essential to animals, it seemed worth while to carry out further investigations upon *in vitro* and *in vivo* L-lysine intestinal absorption.

Methods and results. Male rats, weighing 150–200 g were used, they were fed on a standard diet with at least 12 h fasting before the experiments.

1. Perfusion of isolated surviving rat small intestine. Each animal was killed by decapitation and bled.

The apparatus used for the intestinal perfusion was based on the original DARLINGTON and QUASTEL one[2], but substantially modified to make it more practical (see Figure).

Loops of small intestine of about 25 cm, adjacent to duodenum, were used. As soon as removed from an intact animal, a loop was placed in a small beaker and the inside was washed out with the solutions to be used in the experiments. The upper and lower ends of a loop were then tied on (S) and (S') of the apparatus with a silk thread. Description in fuller details may be found elsewhere[3]).

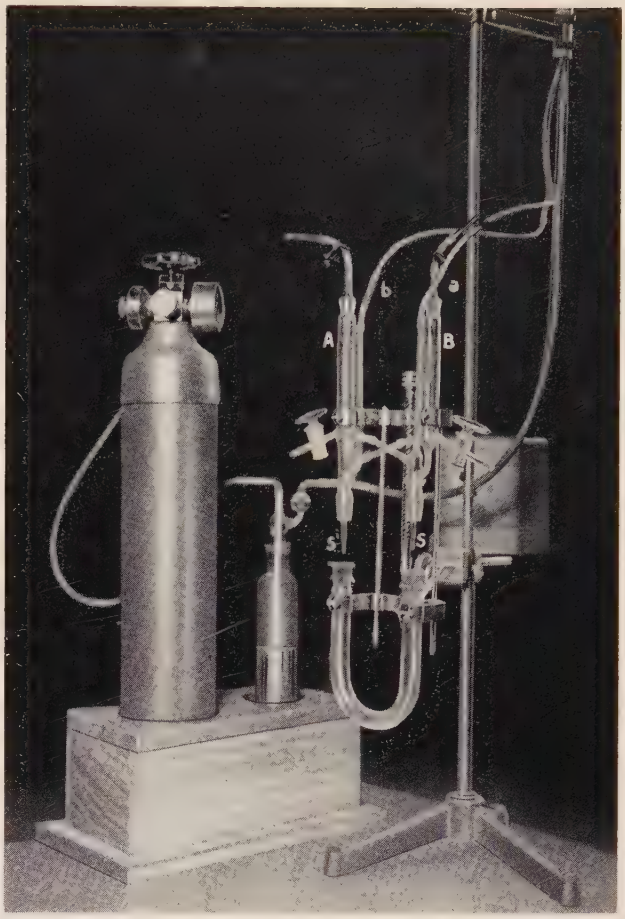
On assembling the intestinal segment in the apparatus, two independent systems are involved: the former inside, the latter outside the intestinal lumen. In both systems, the perfusion fluid runs in opposite directions, if a gas flow is led to the apparatus under a moderate pressure. Gas flows through (a) and (b), which are connected to the reservoirs (A) and (B) by two side connections. Therefore, in passing through (A) and (B) filled with a perfusion fluid (Ringer-bicarbonate), a gas carries some fluid with it in such a way that the level in the reservoirs (A) and (B) are made higher than in (a) and (b). By the difference between the fluid levels, two circulations result: the inner solution running through the intestinal lumen and the outer solution outside.

The apparatus, when in use, is kept in a bath maintained at 38°C.

Samples of inner and outer solutions for lysine estimation are taken through two glass coks on the apparatus; L-lysine is analyzed by the method reported by ALLPORT and KEYSER[4].

Perfusion results are given in Table I, where data of experiments, each corresponding to a different L-lysine concentration are reported.

2. Uptake of L-lysine by intestinal tissue. The small intestine was removed with the same care taken in the previous experiments. After dipping in a Ringer-bicarbonate solution at 38°C, and drying on a filter paper, an isolated loop was then cut into pieces of ÷ 0·25–0·5 cm ÷ 0·25 to 0·50 cm with scissors.



The intestinal tissue was transferred to Warburg flasks of 50 ml capacity, which contained Ringer-bicarbonate buffer, with or without L-lysine.

The flasks were kept in a bath at a constant temperature (38°C). At intervals, samples of the fluid were taken for lysine estimations. At the end of an experiment, the tissue was precipitated with 10% TCA (0·5 ml), then separated from the incubation fluid by centrifugation, and finally minced with Quartz sand in a mortar containing distilled water. Extracts were made, and analyzed for lysine. The volumes of the extracts correspond to the

Table I. Absorption of L-lysine from isolated surviving rat small intestine.

Inner solution: L-lysine as shown in the 1st line, in Ringer-bicarbonate, pH 7; 20 ml. Outer solution: Ringer-bicarbonate, pH 7; 60 ml. Gas: 95% O_2 + 5% CO_2. Duration of an experiment: 60 min; temperature 38°C.

Inner solution	μM L-lysine before the experiment	130	300	653	910	1317	1750
	μM L-lysine/h found after the experiment	90	144	215	316	622	675
Outer solution	μM L-lysine/h found after the experiment	19	58	84	96	74	21

[1] G. WISEMANN, J. Physiol. *127*, 414 (1955).

[2] W. A. DARLINGTON and J. H. QUASTEL, Arch. Biochem. *43*, 194 (1953).

[3] S. DI BELLA, Arch. Sci. biol., in press.

[4] ALLPORT and J. W. KEYSER, *Colorimetric Analysis*, vol. 1, (Chapman and Hall Ltd., London), p. 43.

volumes of the incubation mixtures. The results of an experiment, referring to different L-lysine concentration used, are shown in Table II.

Table II. Uptake of L-lysine from the rat small intestine tissue.

Fresh intestinal tissue: g 1; Substrate: L-lysine as shown in the 1st line, in Ringer-bicarbonate buffer, pH 7; 10 ml; Gas: 95% O_2 + 5% CO_2; duration of an experiment: 60 min; temperature: 38°C.

	μM L-lysine				
Before uptake	90	135	450	810	900
After uptake (60th min)	86	125	337	791	873
Uptake, i.e. theoretical amounts of L-lysine assumed during the experiment	4	10	13	19	27
L-lysine found in intestinal tissue slices after 10% TCA precipitation	2	9·5	11·5	17·5	25

3. L-lysine absorption tests in intact animals. The rats were anesthetised with ether, and the abdomen opened in its midline. The small intestine was then tied off at about 5 cm from the stomach, and in a similar manner at a lower level close to the ileo-cecal valve, with a silk thread. Just near both ligatures a little stoma on the intestinal wall was made, in order to place two small glass funnels at each open end of the intestine. A solution containing Ringer-bicarbonate buffer plus L-lysine was then delivered at the upper end of the intestine. Samples of lysine solution for analysis were taken from the lower glass funnel at fixed times. The results of three experiments are given in Table III.

Table III. Absorption of L-lysine from the rat small intestine *in vivo* L-lysine: 520 μM, in Ringer-bicarbonate buffer pH 7, 5 ml; duration of an experiment: 60 min.

Experiments	1	2	3
	μM L-lysine/h		
L-lysine found in the intestinal lumen after the experiment	73	82	86
Theoretical amounts of absorbed L-lysine	447	438	434

Conclusions. Experiments carried out on the rat small intestine, using different methods, show that L-lysine is taken up actively by the epithelial cells of the mucosa.

The uptake and absorption rates depend on the L-lysine present at various concentrations in the experimental systems.

A relationship has also been found between L-lysine concentration in the intestinal lumen and the rate of its appearance in the outer solution, i. e. the diamino acid transport through the intestinal wall. It is apparent, therefore, that an important limiting factor of the transport reactions in intestinal villi is the lysine concentration.

Acknowledgement: I am grateful to the Richter Co., Milan, and particularly to Dr. K. Korenij, for his kindness in supplying animals for the experiments.

S. Di Bella

Istituto di Chimica biologica, Università di Torino (Italy), December 1, 1959.

Zusammenfassung

L-Lysin wird durch die Rattendarmschleimhaut mit einer je nach den Anfangskonzentrationen verschiedenen Geschwindigkeit absorbiert. Die anfänglichen Lysinkonzentrationen stellen beim Transport der Diaminosäure durch die Darmvilli ein die Reaktionen abschwächendes Moment dar.

The Antagonism of Adrenergic Blockade by Dichloroisoproterenol (DCI)[1]

The compound dichloroisoproterenol (DCI)[2] has been described as a blocking agent of inhibitory adrenergic receptors[3] as well as of the inotropic and chronotropic receptors of the heart[4]. These results suggest that this drug is a specific antagonist of the hypothetical beta receptors (as described by Ahlquist[5]) without exerting appreciable effects on the excitatory (alpha) adrenergic receptors. Thus, the vasodepressor and cardiac stimulant actions of isoproterenol or epinephrine are effectively antagonized by DCI, but no effect is seen against the pressor activity of epinephrine or norepinephrine.

In this report we wish to describe the effect of DCI in antagonizing the blockade of the epinephrine and norepinephrine pressor responses by several of the adrenergic blocking agents. All of these experiments were carried out in pentobarbital anesthetized dogs, and blood pressures were measured from the carotid artery with a mercury manometer. As can be seen in the Figure, the pressor responses to epinephrine and norepinephrine are reversed by a 10 mg/kg dose of dibenzyline. The vasodepressor effect of isoproterenol is not altered by the adrenergic blocking agent. When administered after dibenzyline DCI in doses of 5 to 15 mg/kg was found to produce a depressor response. Subsequent injections of epinephrine and norepinephrine no longer exhibited depressor responses, but were reconverted to pressor effects, indicating that the blockade of excitatory receptors by dibenzyline had been removed. This effect was seen whether the DCI was given 1, 3, or 5 h after the dibenzyline. In all instances the depressor response of isoproterenol was reduced or abolished after the DCI treatment. The magnitude of the epinephrine and norepinephrine pressor responses after the dibenzyline-DCI pretreatment varied with the different experiments, but in general they were at least 50 to 75% of control, and occasionally equal to control responses. If further doses of the adrenergic blocking agent were administered the reconverted pressor effects again decreased, but depressor responses to the catecholamines did not reappear. Similar results were obtained when dihydroergotamine or benzodioxane were employed as the adrenergic blocking agent.

These findings indicate that DCI alters not only the inhibitory (beta) adrenergic responses but also the excitatory effects of epinephrine and norepinephrine after adrenergic blockade. This is especially interesting with dibenzyline since blockade produced by drugs of this series is generally considered to be of the nonequilibrium type[6] with extremely prolonged durations of action[7,8]; yet the administration of DCI immediately restores the vasopressor actions of epinephrine and norepinephrine. The true nature of the observed antagonism of adrenergic

[1] This study was supported in part by a Research Training Grant from the National Institutes of Health.

[2] Dichloroisoproterenol is 1-(3,4-dichlorophenyl)-2-isopropylaminoethanol hydrochloride (Lilly 20522) and was generously supplied by Dr. I. H. Slater of the Lilly Research Laboratories.

[3] C. E. Powell and I. H. Slater, J. Pharmacol. exp. Therap. *122*, 480 (1958).

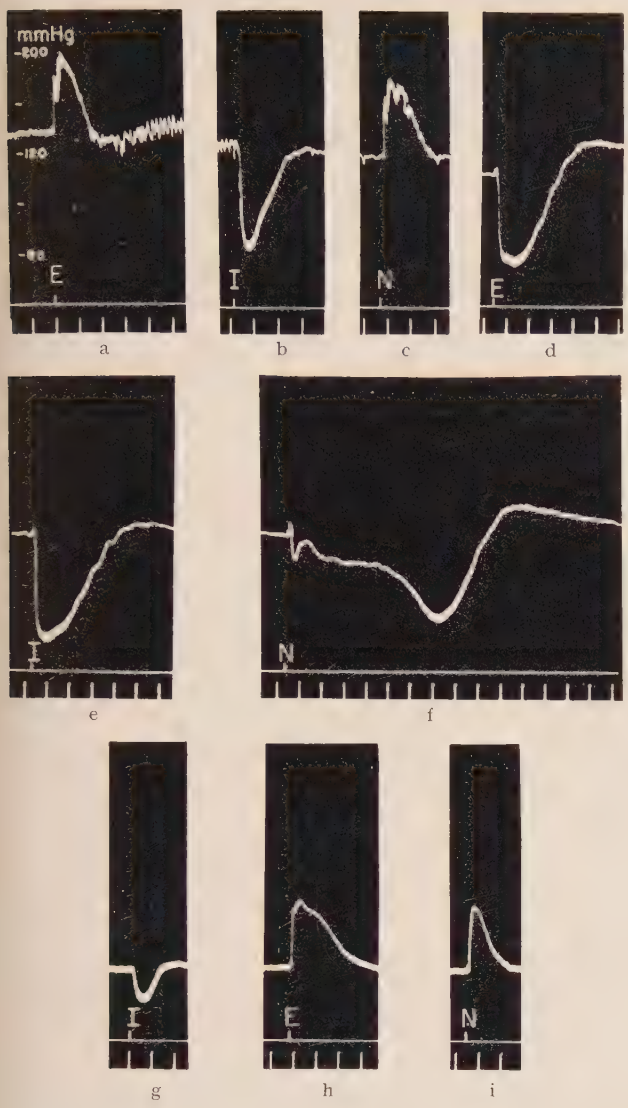
[4] N. C. Moran and M. E. Perkins, J. Pharmacol. exp. Therap. *124*, 223 (1958).

[5] R. P. Ahlquist, Amer. J. Physiol. *153*, 586 (1948).

[6] M. Nickerson, Pharmacol. Rev. *9*, 246 (1957).

[7] J. Axelrod, L. Aronow, and B. B. Brodie, J. Pharmacol. exp. Therap. *106*, 166 (1952).

[8] C. E. Rapela and H. D. Green, Fed. Proc. *18*, 435 (1959).



Recording of the carotid arterial blood pressure of a 8·4 kg male dog anesthetized with 30 mg/kg sodium pentobarbital (Nembutal) intravenously. E. l-epinephrine bitartrate, 5 μg/kg. I. l-isoproterenol hydrochloride, 5 μg/kg. N. l-arterenol bitartrate hydrate, 5 μg/kg. Between C and D the animal received 2 intravenous injections of 5 mg/kg of dibenzyline hydrochloride. Between F and G the animal received 3 slow intravenous injections (over a 5 min period) of 5 mg/kg of dichloroisoproterenol hydrochloride (DCI). All drugs were washed in with 3 ml of normal saline. Time markings represent 1 min intervals. 90 min had elapsed between C and D and 110 min between F and G.

blockade by DCI is at present unknown; there is the possibility that the blocking agents are displaced from the excitatory receptors by DCI, permitting their accessibility to the pressor amines. On the other hand, DCI may, by blocking only inhibitory receptors, permit a greater concentration of the injected catecholamines to overcome an incomplete block of the excitatory receptors. Studies are in progress to determine the mechanism of these interesting observations.

L. D. Hull, L. G. Eltherington, and A. Horita

Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Washington, Seattle (Washington), October 28, 1959.

Zusammenfassung

Mit Dibenzylin vorbehandelte anästhetisierte Hunde reagierten nach Dichloroisoproterenol(DCI)-Verabreichung sofort mit «Pressor response» auf Epinephrin und Norepinephrin. Ähnliche Befunde ergaben sich auch bei adrenergischer Blockade mittels Dihydroergotamin oder Benzodioxan.

The Differences in the Accumulation and Metabolism of Catechol Amines in Heart and Liver[1]

It is known that monoamine oxidase and O-methyl transferase are responsible for the inactivation of catechol amines *in vivo*. However the importance of monoamine oxidase relative to O-methyl transferase in the inactivation of the catechol amines in various tissues is unknown. It is possible that in each organ the action of one or the other enzyme predominates. The present study shows that there are differences in the extent to which the catechol amines are inactivated by monoamine oxidase and O-methyl transferase in heart and liver.

10 ml of $4{\cdot}5 \times 10^{-6}$ solution of norepinephrine-7-H^3 and epinephrine-1-C^{14} with an H^3:C^{14} ratio of 5:1 was infused for 30 min into the femoral vein of untreated and iproniazid-treated cats. Immediately after killing, various organs were removed, homogenized in saline, and then deproteinized with perchloric acid. The extracts of each organ were separated into catechol amine, methoxy catechol amine, and acidic-neutral fractions[2]. The catechol amine fraction after acetylation, was submitted to paper chromatography[3] and the radioactivity was found to be associated with unchanged norepinephrine and epinephrine. The methoxy catechol amine fraction was also acetylated in the same manner and it was shown by paper chromatography that the radioactivity is associated with 3-methoxy norepinephrine and 3-methoxy epinephrine. The acidic-neutral fraction was chromatographed in two different solvent systems[4] and the mobilities of the radioactive zones were identical with 3,4 dihydroxy mandelic acid, 3-methoxy 4-hydroxy mandelic acid, and 3-methoxy 4-hydroxy phenyl glycol.

The H^3 and C^{14} activities of acetylated norepinephrine, epinephrine, 3-methoxy norepinephrine, and 3-methoxy epinephrine obtained after paper chromatography are presented in Table I. The presence of tritium in the epinephrine and 3-methoxy epinephrine zones indicates that norepinephrine is converted into epinephrine in these organs. The absence of C^{14} in the norepinephrine zone in these organs shows that epinephrine is not demethylated to norepinephrine and that N-methylation of norepinephrine to epinephrine is an irreversible process.

A comparison of the activities of the catechol amine, methoxy catechol amine, and acidic-neutral fractions is presented in Table II. The high activity of the acidic-neutral fraction of the heart shows that the catechol amines are, to a large extent, metabolized by monoamine oxidase in the heart. In contrast to such organs as liver, spleen, kidney, and adrenal glands, which accumulated infused norepinephrine and epinephrine in both un-

[1] This investigation supported by grants from Nat. Inst. Health, and presented in part to Fed. Amer. Soc. for exp. Biol., Chicago, April 1960.

[2] M. Goldstein *et al.* *16*, Exper. 211 (1960).

[3] M. Goldstein *et al.*, Exper. *15*, 80 (1959).

[4] M. Goldstein *et al.*, Biochim. biophys. Acta *33*, 572 (1959).

Table I. The H^3 and C^{14} activities of norepinephrine, epinephrine, 3-methoxynorepinephrine, and 3-methoxyepinephrine isolated from heart and liver by acetylation technique and paper chromatography.

Compound	Heart C. p. m. × 10^2 per 1 g tissue				Liver C. p. m. × 10^2 per 1 g tissue			
	H^3		C^{14}		H^3		C^{14}	
		Ipr.[a]		Ipr.		Ipr.		Ipr.
N, O, O-triacetyl norepinephrine	0	5·6	0	0	1·4	3·1	0	0
N, O, O-triacetyl epinephrine	0	0·05	0	0·17	0·03	0·2	0·14	0·35
N, O-diacetyl 3-methoxy norepinephrine	13	22	0	0	12	57	0	0
N, O-diacetyl 3-methoxyepinephrine	0·8	0·6	4·1	8·0	0·3	0·8	4·7	16

[a] Cats treated 6 h prior to infusion with 100 mg/kg Iproniazid.

Table II. The distribution of H^3 and C^{14} in different fractions of heart and liver after an intravenous infusion of norepinephrine-7-H^3 and epinephrine-1-C^{14} (the H^3:C^{14} ratio of the infused solution was 5:1).

Fraction	Heart C. p. m. × 10^2 per 1 g tissue				Ratio		Liver C. p. m. × 10^2 per 1 g tissue				Ratio	
	H^3		C^{14}		H^3:C^{14}		H^3		C^{14}		H^3:C^{14}	
		Ipr.[a]		Ipr.		Ipr.		Ipr.		Ipr.		Ipr.
Catechol amines	0	8·0	0	0·5	—	16	2·4	5·0	0·12	0·23	20	22
Methoxycatechol amines	16·6	24·5	5·8	8·1	2·8	3·1	18·0	60·0	5·6	20·0	3·2	3·1
Acidic-Neutral	17·0	6·8	5·5	2·5	3	2·7	8·2	5·5	3·9	2·4	2·1	2·3

[a] Cats treated 6 h prior to infusion with 100 mg/kg Iproniazid.

treated and iproniazid-treated cats[5], the heart accumulated these compounds only in iproniazid-treated cats. While no unmetabolized catechol amines are found in the hearts of untreated cats, in the treated cats there is an even greater accumulation than in the liver. This indicates that monoamine oxidase inhibitors allowed exogenously infused norepinephrine and epinephrine to accumulate in the heart and therefore demonstrates the importance of this enzyme in the metabolism of the catechol amine in the heart. On the other hand, the activity of the methoxy catechol amine fraction in the heart increases only 1·5–2 times more in the iproniazid-treated cats than in the non-treated cats, while in the liver the activity increases 3–4 times. This demonstrates that O-methyl transferase is relatively less active in the heart than in the liver.

The H^3:C^{14} ratio in each fraction was calculated and is presented in Table II. In the catechol amine fraction of the normal as well as the iproniazid-treated cats, the H^3:C^{14} ratio in the catechol amine fraction was greatly increased as compared with the infused solution. Since norepinephrine was infused as H^3, this higher ratio shows that norepinephrine remains intact to a greater extent than epinephrine. The methoxy catechol amine and the acidic-neutral fraction shows a marked decrease in the H^3:C^{14} ratio as compared with the infused solution. This shows that epinephrine is more rapidly metabolized *in vivo* than norepinephrine in both heart and liver.

The more rapid metabolism of epinephrine compared with norepinephrine may be the result of the faster disappearance of epinephrine from the circulation[6,7]. Other possible factors are competition between norepinephrine and epinephrine for the inactivating enzymes and differences in binding properties of these two compounds.

This study demonstrates that catechol amines in the heart are metabolized to a greater extent by monoamine oxidase than by O-methyl transferase. On the other hand in the liver O-methyl transferase seems to be the enzyme primarily responsible for the inactivation of catechol amines. The role of iproniazid in the accumulation of catechol amines in the heart is of special interest because iproniazid has been shown to be useful in the treatment of angina pectoris. The increase of catechol amine in the heart may lead to coronary dilation[8] and this may explain the effect of iproniazid on angina pectoris.

Other organs have also been investigated and a full report will be published elsewhere.

M. Goldstein, A. J. Friedhoff, S. B. Wortis and S. B. Gertner

N. Y. U. School of Medicine, New York, and Seton Hall College of Medicine, Jersey City (N. J.), May 16, 1960.

Zusammenfassung

Noradrenalin und Adrenalin werden von Katzen nach simultaner intravenöser Darreichung zum Teil unverändert in der Leber und anderen Organen gespeichert, jedoch nicht im Herzen. Nach Vorbehandlung der Tiere mit Iproniazid wird im Herzen ebenfalls eine Anhäufung der beiden Hormone gefunden.

Es wird auch eine relativ grössere Inaktivierung des Adrenalins im Vergleich zu Noradrenalin festgestellt.

[5] M. Goldstein *et al.*, Fed. Proc. *19*, 295 (1960).
[6] G. Cohen *et al.*, J. clin. Invest. *38*, 1935 (1959).
[7] M. Goldstein *et al.*, to be published.
[8] M. Shoshkes *et al.*, Circulation *20*, 17 (1959).

Pharmacological Characteristics of Bradykinin B

The chemical isolation and some pharmacological properties of bradykinin resulting from the interaction of ox plasma and *Bothrops jararaca* venom have recently been described in a short communication from our laboratories[1]. Although chemical and pharmacological analyses have so far revealed no differences between this bradykinin and that obtained from the interaction of ox plasma and trypsin, we should like to designate the former as bradykinin B (*Bothrops*), as opposed to the latter, bradykinin T (trypsin).

Very soon in the course of the purification procedure outlined in our previous communication[1], it became evident that several test methods would have to be used in order to characterise bradykinin B and to differentiate it more accurately from other polypeptides acting on smooth muscle (isolated gut and uterus; blood-pressure response, etc.).

The following is a short account of the pharmacological properties of the purest bradykinin B[2] preparation available (CIBA 27 994-Ba).

Methods. Tests were performed on the following isolated organs:

A) 1. Terminal guinea-pig ileum suspended in Mg-free Tyrode; bath volume: 20 ml;

2. Rat colon suspended in de Jalòn's fluid; bath volume: 20 ml; and

3. Rat uterus suspended in de Jalòn's fluid; bath volume: 20 ml.

In addition, the preparation was tested *in vivo* as follows:

B) 1. Blood-pressure (bl' pr') of the cat anaesthetised with Dial-urethane (Dial-CIBA®, 30 mg/kg i. p. and 30 mg/kg s. c.);

2. Bl' pr' of the rabbit anaesthetised with urethane (1,5 g/kg, administered intravenously); and

3. Bl' pr' of the cock anaesthetised with phenobarbital-sodium = Luminal®-Na(180–200 mg/kg, administered into the pectoral muscle).

C) Bradykinin B was also injected intracutaneously in varying local concentrations (0·001–0·3 µg) into the dorsal skin of male albino guinea-pigs which had been injected beforehand intravenously with 'Pontamine'®, Sky Blue 6 BX (5% in saline; 0·1 ml/100 g body weight). Dye extravasation was measured in flaps of reflected skin from animals sacrificed 30 min after intracutaneous administration of bradykinin B.

Results. A: 1. The isolated terminal guinea-pig ileum contracted upon addition of bradykinin B in final concentrations as low as 1 to 3×10^{-12} (g/ml), i.e. 1 to 3 ng/ml.

2. The isolated rat colon proved slightly less sensitive to bradykinin B (bB) than the guinea-pig ileum inasmuch as concentrations of $5\text{–}10^{-12}$ to 1×10^{-11} caused contractions of the rat organ which were quantitatively about equal to the contractions elicited by synthetic angiotensin[3,4] in concentrations of $1\text{–}3 \times 10^{-8}$.

3. The isolated rat uterus responded to concentrations of bB even lower—roughly 10 times lower—than those causing contractions of the isolated guinea-pig ileum or the rat colon.

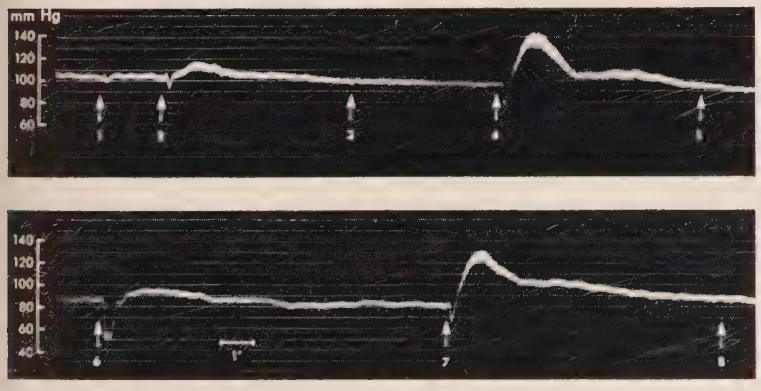
In all the experiments mentioned above in § 1 to 3, bradykinin B caused contractions of the respective test-organ which differed from those produced by fast-acting substances such as histamine or 5-hydroxytryptamine (serotonin) in that they started with a short latency of 5 to 15 sec and reached their maximum effect only after the substance had been in contact with the respective test-organ for 30–120 sec. On the whole, no noticeable tachyphylaxis or hyporeactivity were observed when bradykinin B was administered every 8th min and washed out after the contraction had reached its maximum. In addition, it was noted that neither atropine sulphate nor mepyramine in final concentrations of 1×10^{-8} caused any appreciable reduction in the contractile response of the guinea-pig ileum. Bradykinin B thus displayed an activity which was described in 1938 by Feldberg and Kellaway as typical of so-called 'slow-reacting substances' = 'SRS'[5].

B: On the blood-pressure of the anaesthetised cat, rabbit, and cock, purified bradykinin B displayed the following activities:

1. In both the cat and the rabbit, bradykinin B acted as a depressor substance in dosages starting from 10 to 30 ng/kg; in doses of 30–100 ng/kg depressor reactions of 20–50 mm. Hg were obtained in both species and lasted from 1–5 min.

2. In the cock, dosages of 10 ng–3 µg/kg of bB did not cause any appreciable alteration in the bl' pr', in spite of the fact that in the same animal Pitressin® or angiotensin (synthetic hypertensin, CIBA) caused depressor or pressor responses in dosages of 0·3 I. U. or 1 µg/kg respectively. An example of this behaviour of the cock's bl' pr' in response to i. v. administration of Pitressin®, synthetic angiotensin, and bB is illustrated in the following Figure.

C: Administered intracutaneously in guinea-pigs which had been pre-treated with Pontamine®, bradykinin B caused extravascular leakage of circulating dye when given



Effect of various polypeptides on the arterial blood-pressure of the cock (body weight: 2·4 kg, anaesthetised with Luminal®-Na, 200 mg/kg, i. m.).

At arrows numbered 1–8, the following substances or solutions were injected intravenously: 1) 1·0 ml physiological saline; 2) hypertensin, 0·3 µg/kg; 3) bradykinin B, 1·3 µg/kg; 4) hypertensin, 1·0 µg/kg; 5) bradykinin B, 2·6 µg/kg; 6) vasopressin (Pitressin®), 0·4 I. U./kg; 7) hypertensin, 1·0 µg/kg; 8) bradykinin B, 2·6 µg/kg.

N.B. There is a 5-min interval between the end of the upper tracing and the beginning of the lower tracing.

[1] H. Zuber and R. Jaques, Helv. chim. Acta *43*, 1128 (1960).

[2] The bradykinin B sample under consideration was prepared in our laboratories by Dr. H. Zuber and Prof. R. Schwyzer.

[3] R. Meier, F. Gross, J. Tripod, and H. Turrian, Exper. *13*, 361 (1957).

[4] W. Rittel, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, and R. Schwyzer, Helv. chim. Acta *40*, 614 (1957); Angew. Chemie *69*, 179 (1957).

[5] W. Feldberg and C. H. Kellaway, J. Physiol. *94*, 187 (1938).

[6] A. A. Miles and D. L. Wilhelm, Brit. J. exp. Path. *36*, 71 (1955); Nature *181*, 96 (1958).

[7] W. G. Spector and D. A. Willoughby, Nature *181*, 708 (1958); J. Path. Bact. *77*, 1 (1959); Nature *182*, 949 (1959).

in local concentrations of 0·03–0·01 μg (contained in 0·1 ml physiological saline). Thus, bradykinin B proved very active in causing increased capillary permeability in the guinea-pig. Lacking any direct comparison on the very same test object between bB and, for example, Miles' permeability factor (PF/Dil)[6], or the mediators described by Spector and Willoughby[7], no comparison is yet possible between the permeabilising activity of either substance.

The authors are indebted to Miss E. Heitz and Miss C. Zuber for their valuable technical assistance during these experiments.

R. Jaques and R. Meier

Pharmazeutische Abteilung der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, June 13, 1960.

Zusammenfassung

Die pharmakologischen Effekte (*in vitro* und *in vivo*) eines durch Einwirkung von Schlangengift (*Bothrops jararaca*) auf Rinderplasma erhaltenen, reinen Bradykinins (B) werden beschrieben.

Post Mortem Increase of 5-Hydroxytryptamine in Rat Brain after 5-Hydroxytryptophan Administration

In several animal species injection of 5-hydroxytryptophan (5HTP) causes an increase of 5-hydroxytryptamine (5HT) in the brain which can be enhanced by pretreatment with monoamine oxidase inhibitors, e. g. iproniazid[1–4]. This 5HT accumulation has been attributed to the fact that 5HTP easily penetrates the brain in which decarboxylation occurs. In presence of great amounts of 5HTP the formation of 5HT probably exceeds its catabolism so that the amine accumulates. This is particularly the case when MAO is blocked.

In the present paper it is shown that 5HTP induced increase of 5HT in brain does not occur *in vivo* only but still continues after decapitation.

Methods. Male Wistar rats fasting for 16 h and weighing 60 to 80 g were decapitated 30 min after i. p. injection of 75 mg/kg DL-5HTP. Part of the animals received 100 mg/kg iproniazid (i. p.) $16^1/_2$ h before 5HTP. The brains were homogenized in 0·1 *n* HCl either immediately after killing (shortest intervall 60 sec) or after the following procedures:

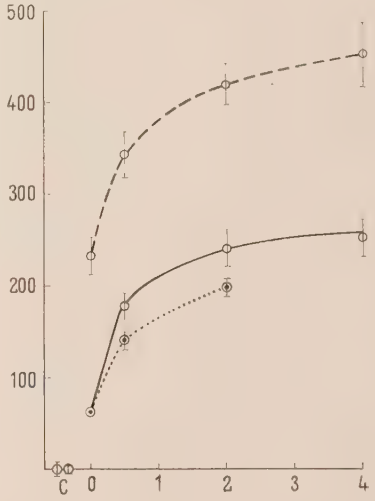
(a) Storage of severed skulls at room temperature and 37°C in closed wet chambers for $^1/_2$ to 4 h.
(b) Storage of whole brains removed immediately after killing in 0·1 *n* HCl at room temperature for 2 h.
(c) Dropping of the skulls into liquid nitrogen immediately after decapitation, removal of the frozen brains in the cold room and homogenization in ice cooled 0·1 *n* HCl.

Animals not treated with 5HTP served as controls. 5HT was determined by a spectrophotofluorometric method[5].

Results. (1) The 5HT content of rat brain was significantly higher after 5HTP injection than in normal animals. The increase of 5HT amounted to 63 ± 5% if the skulls were dropped into liquid nitrogen or to 59 ± 7% in brains taken out at room temperature and homogenized immediately after killing. The difference is not significant ($p > 0{\cdot}05$). Iproniazid pretreatment enhanced this 5HTP induced 5HT increase significantly ($p < 0{\cdot}01$), (Figure, time 0).

(2) If the severed skulls were kept at 37°C before homogenization a further continuous 5HT rise in brain occurred. This was the case in animals with and without iproniazid pretreatment before administration of 5HTP. Storing of the skulls at room temperature had a similar but somewhat less effect (Figure).

(3) Brains of control animals without any treatment kept for 2 h at 37°C showed a significant 5HT decrease during the first half hour as compared with normal brains homogenized immediately after death. In animals only pretreated with iproniazid incubation of the brains for 2 h at 37°C caused no significant change in the 5HT content (Table).



Post mortem increase of 5 HT in brain of rats treated with 75 mg/kg 5 - hydroxytryptophan i. p. 1/2 h before death.

Abscissa. Time in h after decapitation. 0 time = immediate removal and homogenization after decapitation. *Ordinate.* Percentage 5 HT increase as compared with controls (C) not pretreated with 5 HTP.

○——○ No treatment with iproniazid. Storage of skulls at 37°C.
○- - -○ i.p. injection of 100 mg/kg iproniazid $16^1/_2$ h before death. Storage of skulls at 37°C.
⊙ ····· ⊙ No iproniazid treatment. Storage of intact brains in 0·1 *n* HCl at room temperature.

Each point represents average of 8–10 single values with standard error. 5 HT of 22 control rats (C) amounted to 0.52 ± 0.02 μg/g fresh weight of brain.

Time *post mortem* (h)	0	1/2	2
No pretreatment	100 ± 4	*80 ± 2*	*82 ± 2*
Iproniazid pretreatment	100 ± 4	98 ± 8	103 ± 8

5 HT content in % of normal brains at various intervals after death. Incubation of intact brain at 37°C. 100 mg/kg iproniazid were administered i. p. 16 h before decapitation. Each figure represents the average value of 6 experiments with standard error. Brains removed immediately after decapitation (time 0) served as controls. The underlined values are significantly different from control values ($p < 0{\cdot}01$).

[1] S. Udenfriend, D. F. Bogdanski, and H. Weissbach, Fed. Proc. *15*, 449 (1956); J. biol. Chem *224*, 803 (1957).
[2] S. Udenfriend, H. Weissbach, and D. F. Bogdanski, Ann. N. Y. Acad. Sci. *66*, 602 (1957).
[3] A. Pletscher, Schweiz. med. Wschr. *87*, 1532 (1957).
[4] K. Freter, H. Weissbach, S. Udenfriend, and B. Witkop, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *94*, 725 (1957).
[5] D. F. Bogdanski, A. Pletscher, B. B. Brodie, and S. Udenfriend, J. Pharmacol. exp. Therap. *117*, 82 (1956).
[6] C. T. Clark, H. Weissbach, and S. Udenfriend, J. biol. Chem. *210*, 139 (1954).
[7] J. A. Buzard and P. D. Nytch, J. biol. Chem. *227*, 225 (1957).
[8] A. Yuwiler, E. Geller, and S. Eiduson, Arch. Biochem. Biophys. *80*, 162 (1959).
[9] See A. Pletscher, K. F. Gey, and P. Zeller, *Monoaminoxydase-Hemmer: Biochemie, Chemie, Pharmakologie, Klinik*, Fortschr. Arzneimittelforsch., Bd. II (Birkhäuser Verlag, Basel, in press).

(4) Storage of intact brains of 5HTP-treated animals for 2 h in 0·1 *n* HCl at room temperature caused a significant 5HT increase (118 ± 11%) as compared to brains homogenized immediately after death (53 ± 10%; $p < 0{\cdot}01$). This 5HT rise was, however, significantly less than that in brains kept at room temperature but not in HCl (226 ± 22; $p < 0{\cdot}01$).

Discussion. The present results with rat brain frozen or homogenized immediately after decapitation confirm that 5HTP causes a significant 5HT rise which is markedly enhanced by pretreatment with iproniazid. The findings show, however, that storage of the brain at room temperature or at 37°C after death causes a further considerable 5HT increase. This rise cannot even be completely abolished by keeping the intact brain in 0·1 *n* HCl.

In earlier experiments this post mortem rise of 5HT might not have been considered. Thus the reported values for the 5HTP induced increase of 5HT in brain were possibly too high and did not reflect the true content *in vivo*. In order to get more reliable results it is necessary to homogenize the brains in HCl or to freeze the skulls immediately after death.

The 5HT accumulation after death is probably due to continuing decarboxylation of injected 5HTP penetrated into the brain. This agrees with the fact that 5HTP decarboxylase does not require oxygen[6–8]. Monoamine oxidase activity, however, which strongly depends on oxygen tension[9] is probably reduced markedly after decapitation so that the newly formed 5HT mostly accumulates. The slight decrease of 5HT in brain of untreated animals during the first half hour *post mortem* can possibly be attributed to a limited amount of oxygen still present which enables a small MAO activity. Other metabolic pathways for 5HT seem not to be involved since this small disappearance of 5HT is blocked by iproniazid.

K. F. Gey and A. Pletscher

Pharmazeutische Abteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, May 27, 1960.

Zusammenfassung

Ratten mit und ohne Iproniazid-Vorbehandlung erhielten 30 min vor Dekapitation 5-Hydroxytryptophan (5HTP) i. p. Das intakte Hirn wurde bis zu 4 h bei 37°C, Zimmertemperatur und in 0·1 *n* HCl aufbewahrt. In allen Fällen ergab sich eine starke postmortale 5-Hydroxytryptamin (5HT)-Vermehrung im Gehirn.

Bei unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich postmortal ein leichter 5HT-Abfall im Gehirn, der durch Iproniazid-Vorbehandlung aufgehoben wurde.

A New View on an Old Drug: Pilocarpine

Pilocarpine is one of the oldest parasympathomimetic drugs. Where the action upon the iris[1], the salivary glands, the sweat glands, and intestinal smooth muscle is concerned, pilocarpine shares the action of muscarine and acetylcholine[2]. There are, however, many reports[3] from which it appears that pilocarpine has a more complex mode of action. Especially its action upon the heart and the sacral parasympathetic nerve endings is contradictory to that of muscarine. Moreover, the effect of muscarine on the heart can be abolished by pilocarpine in larger doses[4].

It has been found that progressive elongation of the alkylchain in 2-alkyl-4-(trimethylammonium)methyl-1:3-dioxolane ($RFMe_3$) causes a gradual decrease in the intrinsic activity and consequently a gradual change from parasympathomimetics into parasympatholytics[5]. The intrinsic activity[6], being high (1) for a mimetic, low (0) for a lytic, and intermediate for a partial agonist[7], is a measure for the ratio of agonistic-competitive antagonistic actions. The transition substance $PrFMe_3$ has an intermediate intrinsic activity (0·5) and hence exerts both a parasympathomimetic and a parasympatholytic influence. $PrFMe_3$ is an example of a partial agonist or competitive dualist.

These findings led to the supposition that pilocarpine might be an example of a natural dualistic drug. This implies that pilocarpine would behave both as a parasympathomimetic and a parasympatholytic like $PrFMe_3$. Consequently pilocarpine has to act synergistically with low doses of acetylcholine, but competitive-antagonistically with high doses of ACh.

As a partial agonist, the maximal height of the dose-response curve of pilocarpine on the intestine should necessarily be a fraction of that of acetylcholine. This, as a matter of fact, appeared to be true, as may be seen from Figure 1. The maximal response of pilocarpine is actually about 70% of that of a pure parasympathomimetic such as acetylcholine or furmethonium (HFurf).

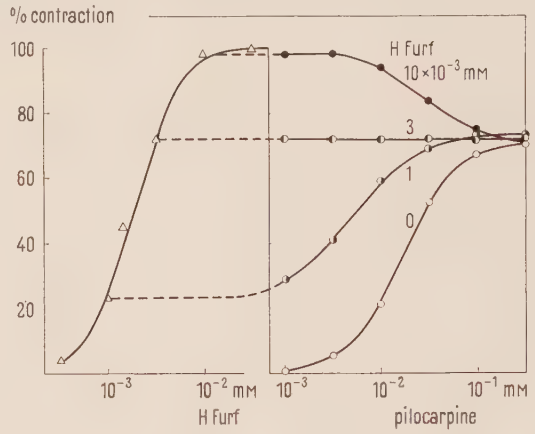


Fig. 1. a) Dose-response curve for the parasympathomimetic furmethonium (HFurf). b) Dose-response curves for the partial agonist pilocarpine in the presence of various doses of HFurf on the isolated gut of the rat.

Note the parasympathomimetic action of pilocarpine in the absence of furmethonium and the competitive antagonistic action when the intestine is brought into contraction by high doses of furmethonium. When a contraction is produced by the agonist equal to the maximal contraction possible with pilocarpine, the latter drug only displaces furmethonium from the receptors without altering the degree of contraction.

[1] J. N. Langley, J. Physiol. *1*, 173 (1876).

[2] H. H. Meyer and R. Gotlieb, *Die experimentelle Pharmakologie* (Urban and Schwarzenberg, Berlin 1936).

[3] J. N. Langley, *Le sytéme nerveux autonome* (Vigot, Paris 1923). – D. Bovet and F. Bovet-Nitti, *Médicaments du systéme nerveux végétatif* (S. Karger, Basel 1948).

[4] A. Gaisböck, Arch. exp. Path. Pharmak. *66*, 398 (1911). – N. Suda, Nippon Yakurigaky Zasshi *53*, 881 (1957).

[5] J. M. van Rossum and E. J. Ariens, Exper. *13*, 161 (1956).

[6] E. J. Ariens, Arch. int. Pharmacodyn. *99*, 32 (1954). – E. J. Ariens, J. M. van Rossum, and A. M. Simonis, Arzneim.-Forsch. *6*, 282 (1956).

[7] R. P. Stephenson, Brit. J. Pharmacol. *11*, 379 (1956).

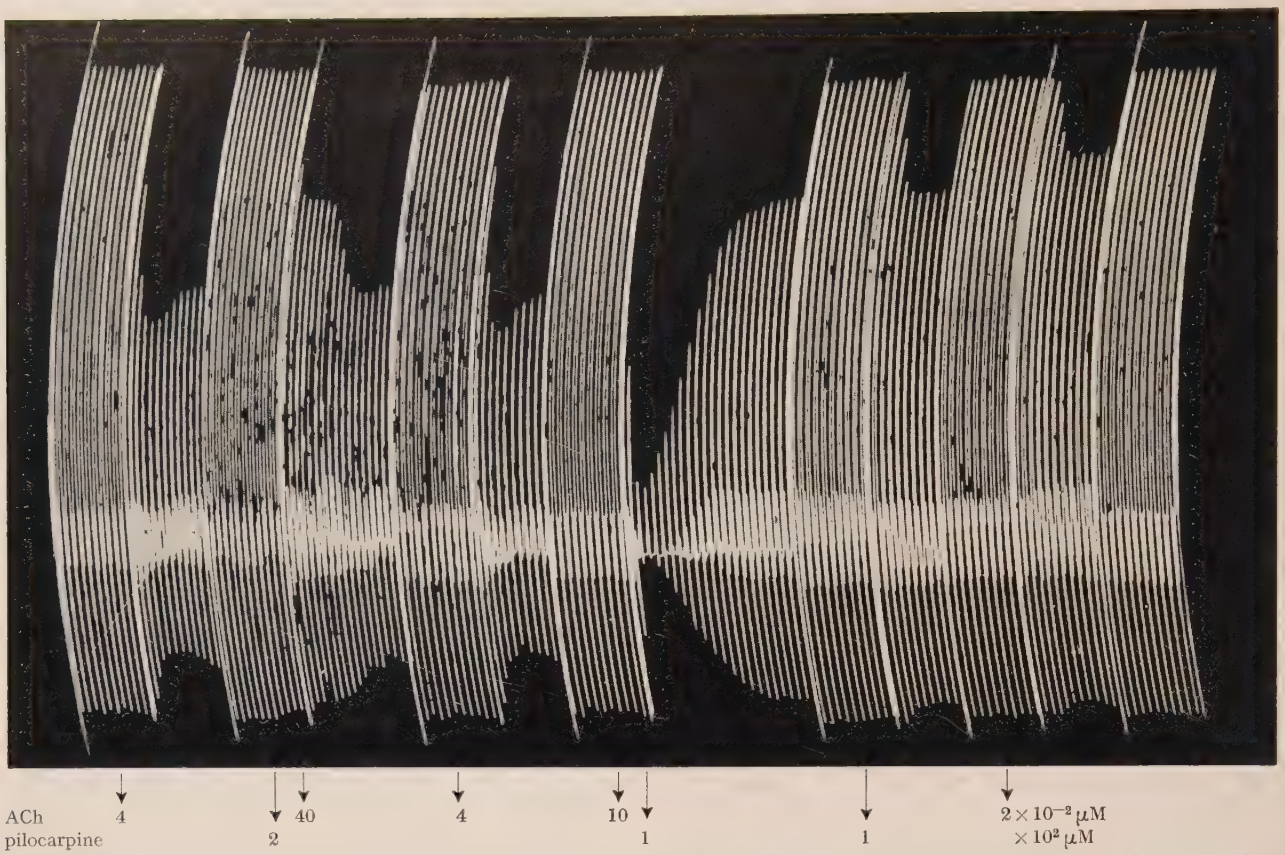


Fig. 2. Registrogram of the spontaneous heart beats of the isolated frog heart (*Rana temporaria*) and the effects of ACh, pilocarpine, and their combinations. Pilocarpine abolishes the depression of the heart beat by ACh, while pilocarpine as such also produces a depression and is able to protect the heart against large concentrations of ACh. Note a slight agonistic and mainly antagonistic action of pilocarpine.

The intrinsic activity (i.a.) is expressed as the ratio between the maximal response of a drug and that of acetylcholine, while the affinity[8] is expressed as a pD_2 value, being the negative logarithm of the molar concentration which produces 50% effect in the dose-response curve. Intrinsic activities and pD_2 values are collected in Table I.

Since the intrinsic activity and the affinity are dependent on the molecular properties of both the drug and the specific receptors for different biological objects, a variation in both parameters is possible. It is logical that the dependence of the intrinsic activity on various objects becomes especially evident as regards partial agonists[9]. In fact it appeared from studies on the relationship between structure and activity in the $RFMe_3$ series that $PrFMe_3$ is a partial agonist in the rat intestine, but a competitive antagonist on the frog heart, whereas on the blood pressure of the cat it is a pure agonist[9].

It might therefore be expected that the intrinsic activity of pilocarpine on the frog heart is lower than on the intestine. This also was found to be the case; consequently pilocarpine on the frog heart behaves mainly like atropine. Pilocarpine prevents the depression of the heart beat as caused by ACh (antagonistic effect), whereas as such it depresses the heart action to a slight degree (agonistic effect) (see Fig. 2). Larger doses produce only the same slight depression which implies that the intrinsic activity on the frog heart is only about 0·2. Moreover pilocarpine abolished the effect of high concentrations of ACh in a competitive way. As may be expected, the recovery under pilocarpine is not, however, complete (see Fig. 2).

Also a nicotinic action has been ascribed to pilocarpine[10]. Since the rat intestine is not sensitive to nicotinic actions,

Table I. Effect in isolated organs

Drug	Rat Intestine			Frog Heart		
	i. a.	pD_2[a]	pA_2	i. a.	pD_2	pA_2
ACh	1	7·0		1	7·1	
HFurf	1	5·9		1	5·3	
Pilocarpine	0·6–0·8	5·0		0·1–0·2		3·8
Atropine	0		8·7	0		7·4

[a] pD_2 and pA_2 are mean values with a confidence range of 0·1 above and below the number given

Table II. Effects on the blood pressure of the cat

Drug	Parasympathomimetic action		Ganglionic action		Ratio ps/g activity
	i. a.	log aff.[a]	i. a.	log aff.[a]	
ACh	1	9·8	1	5·8	10^4
HFurf	1	8·9	1	4·5	$3 \cdot 10^4$
Pilocarpine	1	7·3	—	< 4	$> 2 \cdot 10^3$
Nicotine	—	—	1	6·3	< 1

[a] Negative logarithm of equiactive molar concentrations

[8] E. J. Ariens and J. M. van Rossum, Arch. int. Pharmacodyn. *110*, 275 (1957).

[9] J. M. van Rossum and E. J. Ariens, Arch. int. Pharmacodyn. *118*, 447, (1959).

[10] A. Harnack and H. Meyer, Arch. exp. Path. Pharmak. *12*, 366 (1880).

the parasympathetic actions on the rat intestine, however, are not disturbed by possible ganglionic actions. Ganglionic actions may be observed in objects which are not sensitive to parasympathetic actions, as for instance the blood pressure of the atropinized cat. Parasympathomimetic and ganglionic activities were studied on the blood pressure of the cat; the results are collected in Table II. From this Table, it may be seen that the ganglionic activity of pilocarpine is actually extremely low.

The mode of action of pilocarpine, however, is still more complex since in high doses ($>1\ mM$) papaverine-like actions become apparent in the intestine. On the same object, papaverine is active in concentrations of $10^{-2}\ mM$. This implies that pilocarpine behaves both as an agonist and as a competitive antagonist in low doses, and as a non-competitive antagonist in high doses.

Pilocarpine is an example of a parasympathetic drug with a dualism in action. Its intrinsic activity varies for different organs and species. Hence pilocarpine is more muscarinic in its effect on certain organs but more atropinic on others.

J. M. van Rossum, with the assistance of
M. J. W. J. Cornelissen, C. Th. P. de Groot, and J. A. Th. M. Hurkmans

Pharmacological Institute, R. C. University of Nijmegen (the Netherlands), January 13, 1960.

Zusammenfassung

Pilocarpin ist ein geeignetes Beispiel einer parasympathischen Substanz mit dualistischer Wirkung. Auf Grund der Variationen in der Eigenaktivität (intrinsic activity) des Pilocarpins an verschiedenen Organen und Arten tritt entweder die parasympathomimetische oder die parasympatholytische Wirkung in den Vordergrund.

Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase after Hepatic Artery Ligature

Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) is a very sensitive index of acute necrosis of many tissues, including the heart, liver, kidneys, bowel, and lungs (Lionel *et al.*[1]).

Experimental destruction of liver tissue by carbon tetrachloride was investigated by Wroblewski and La Due[2]. The level of SGOT was found by these authors to be a highly specific index of hepatocellular injury: the height and duration of enzymatic activity was proportional to the amount of carbon tetrachloride, as well as to the extent of liver cell damage.

Ligation of the hepatic artery, which was introduced by Rheinhoff[3], is performed in Egypt in the treatment of advanced cases of hepatosplenomegaly with ascites. In view of the fact that the results are controversial and the mortality rate is as high as 20% (Shalaby[4]; Khairy[5]), the present work was undertaken to study the effect of this operation on the SGOT level in an effort to assess the extent of hepatocellular damage which accompanies such a procedure.

The operation was performed on six dogs weighing between 9 and 10 kg. The hepatic artery was ligated distal to the right gastric branch. The animals were divided into two groups of three.

Animals of group I received no antibiotics and animals of group II received 0·5 g of Achromycin daily, 2 days prior to the operation and through the post-operative period.

In a third group of animals (3 dogs), laparatomy was performed using the same technique applied to group I and II but without ligating the hepatic artery (control experiment). SGOT was estimated according to the method of Dubach[6].

As regards group III, no rise in enzyme level was detected.

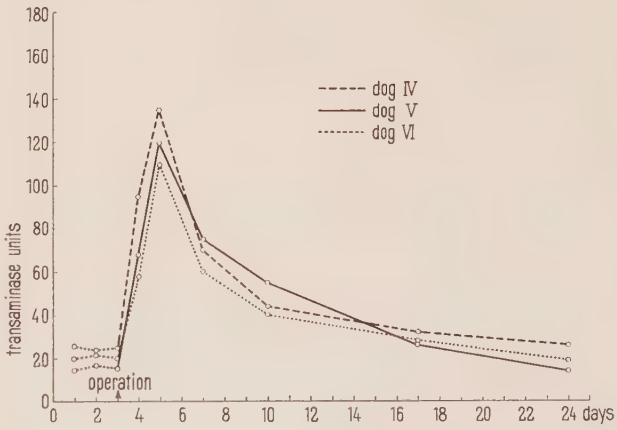
A review of these results indicates that hepatic artery ligature caused a rapid liberation of the enzyme from the anoxic liver cells into the blood stream. The enzyme level in the serum reached a maximum after 24 or 72 h. These results are in agreement with data obtained with other tissues like heart, kidneys, and lungs after ligation of their arterial supply (Lionel *et al.*[7]).

Table I. Animals of group I, SGOT units per ml

	h after operation						
	0	6	12	24	48	72	96
Dog I	25	28	42	65	125	132	Died
Dog II	10	10	35	50	160	Died	
Dog III	15	17	28	55	115	145	Died

Table II. Animals of group II, SGOT units per ml

	Days before operation		Operation Day	Days after operation						
	2	1		1	2	3	4	7	14	21
Dog IV	26	24	25	95	135	100	70	44	32	26
Dog V	15	17	16	68	120	95	75	55	26	14
Dog VI	20	22	20	58	110	80	60	40	28	19



[1] A. Lionel, J. A. Shaefer, R. E. Dutton, and R. H. Lyons, J. Lab. clin. Med. *49*, 31 (1957).
[2] F. Wrobiewski and J. S. La Due, J. clin. Invest. *34*, 973 (1955).
[3] W. F. Rheinhoff, Bull. Johns Hopkins Hosp. *88*, 375 (1951).
[4] S. Shalaby, Gazette of Kasr-El-Aini Faculty of Medicine *21*, 33 (1955).
[5] M. Khairy, J. Egypt. med. Assoc. *40*, 396 (1957).
[6] U. C. Dúbach, Schweiz. med. Wschr. *87*, 185 (1957).
[7] A. Lionel, J. A. Shaefer, R. E. Dutton, and R. H. Lyons, J. Lab. clin. Med. *49*, 31 (1957).

Using SGOT activity as an index of acute liver destruction, it is concluded that there is evidence of liver necrosis which is almost of the same magnitude in animals of group I and II. Biopsy and histological examination of the livers of animals of group I showed definite focal necrosis similar to that found in the livers of animals of group II, whereas biopsy taken after the 4th week (when the enzyme level is normal) showed no evidence of residual liver damage suggesting that the damage caused by hepatic artery ligature was not progressive but recoverable.

The fact that the height of the enzyme level was of the same order in animals of group I and II shows that Achromycin did not alleviate the necrosis caused by this operation. It is therefore suggested that the role of Achromycin is to inhibit the growth of microorganisms which in all probability are responsible for the death of animals of group I.

Stimulated by these results, a similar study on SGOT activity was undertaken in patients undergoing hepatic artery ligature. Preliminary findings in 2 cases showed a rise in enzyme level similar to that obtained with experimental animals.

The authors wish to express their most sincere gratitude to Sandoz Scientific Office, Cairo, for the generous gift of chemicals which made this work possible.

A. R. Fahmy, M. Talaat, and M. A. Zachary

Physiology Department, Kasr-El-Aini Medical Faculty, University of Cairo (Egypt), December 7, 1959.

Zusammenfassung

Bei Hunden verursacht die Ligatur der Arteria hepatica einen starken Anstieg der Serum-Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase-Werte mit Maxima am dritten oder vierten Tag. Der Anstieg wird auf die bioptisch feststellbare Nekrose von Leberzellen zurückgeführt, die mit und ohne Verabreichung von Achromycin gleich stark ausgeprägt war.

Die Wirkungsweise des Achromycins wird diskutiert und auf Parallelergebnisse an Patienten hingewiesen.

Release of Noradrenaline from Adrenergic Transmitter Granules by Tyramine

It was observed in 1932 by Burn[1] that tyramine is devoid of vasoconstrictor action when tested on the denervated foreleg of the cat, but that addition of adrenaline restores its constrictor action. The effect has later been interpreted by assuming that tyramine releases noradrenaline from the stores[2–4]. These are presumably chiefly located at the terminal parts of the adrenergic axones[5]. According to Fleckenstein and Stöckle[6], the inhibitory action of cocaine on the action of tyramine is due to the blocking of noradrenaline release.

Very little is known about the releasing action of tyramine on the adrenal medulla and other chromaffin cell groups, or whether tyramine can exert this action on decentralized or denervated organs.

Recently Schümann[7] has reported that tyramine releases noradrenaline from isolated chromaffin cell granules when added in concentrations of 15–300 µg per ml. It is also stated that tyramine releases noradrenaline from isolated adrenergic nerve granules.

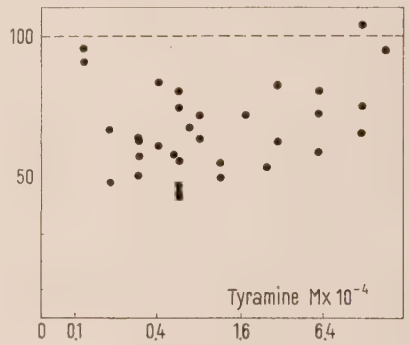
The effect of tyramine and 3-hydroxytyramine (dopamine) on the release of noradrenaline from isolated adrenergic nerve granules will be described in the present report.

Methods. Granules from splenic nerves were prepared according to the technique of Euler[8] and Euler and Lishajko[9]. After resuspension of the sediment in 0·08 *M* potassium phosphate at pH 6·7–7·0, it was incubated at 20°C for 30 min with a solution of tyramine hydrochloride at the same pH. After incubation, the suspension was resedimented by centrifugation at 30000 × *g* for 30 min. Noradrenaline was estimated by the fluorimetric technique of Euler and Lishajko[10] in the supernatant and in the sediment after releasing the noradrenaline by addition of 1 ml 1% metaphosphoric acid.

Similar experiments were made with 3-hydroxytyramine and with 4-hydroxyphenyletanolamine (octopamine).

Results. The Figure shows the amount of noradrenaline in the sediment after incubation for 30 min at pH 7·0–7·4 and recentrifugation, in % of the control value. As seen from the Figure, tyramine causes a release of transmitter when present in concentrations of 3–100 µg per ml. The effect is most conspicuous in the concentration range of 3–20 µg/ml but there is no sharply defined maximum. The maximal effect observed during the prevailing conditions was a lowering of the amount present in the sediment to about 40–50% of that in the controls.

No certain effect was obtained with 3-hydroxytyramine or octopamine in the same concentration range (3–300 µg/ml).



Effect of tyramine on the release of noradrenaline from granules isolated from bovine splenic nerves during incubation at + 20°C for 30 min. *Ordinate.* NA in sediment in % of controls.

[1] J. H. Burn, J. Pharmacol. exp. Ther. *46*, 75 (1932).
[2] A. Fleckenstein, Arch. exp. Path. Pharmak. *218*, 117 (1953).
[3] J. H. Burn and M. J. Rand, J. Physiol., Lond. *144*, 314 (1958).
[4] J. H. Burn and M. J. Rand, J. Physiol., Lond. *147*, 135 (1959).
[5] U. S. von Euler, Harvey Lecture, New York (1960).
[6] A. Fleckenstein and D. Stöckle, Arch. exp. Path. Pharmak. *224*, 401 (1955).
[7] H. J. Schümann, Arch. exp. Path. Pharmak. *238*, 41 (1960).
[8] U. S. von Euler, Acta physiol. scand. *43*, 155 (1958).
[9] U. S. von Euler and F. Lishajko, Science, to be published (1960).
[10] U. S. von Euler and F. Lishajko, Acta physiol. scand. *45*, 122 (1959).
[11] U. S. von Euler, Ciba Foundation Symposium on *Adrenergic Mechanisms*, London (1960).

Discussion. The results confirm the statement of SCHÜMANN[7] that tyramine can release noradrenaline from adrenergic nerve granules. The effect differs markedly from those obtained with reserpine[9] and promethazine[11], however, which show a definite dependance on the dose and a much stronger maximal action. The results therefore suggest an action of a different kind from that obtained with the drugs mentioned.

On the other hand, the action is considerable even in small doses of tyramine (3 µg/ml) and may be relevant for the releasing action observed with tyramine *in vivo* and in perfused systems.

According to SCHÜMANN[7], dopamine does not exert a releasing effect on granules. Our results seem to confirm this finding.

The amounts found in the supernatant, after incubation with tyramine and recentrifugation, were increased to an extent corresponding to the deficit in the sediment. The maximal release never exceeded 75% of the total amount present in the primary sediment.

U. S. VON EULER and F. LISHAJKO

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), May 4, 1960.

Zusammenfassung

Tyramin (3–50 µg/ml) setzt aus mikrogranularem Sediment von Kuhmilznerven Noradrenalin frei (Inkubation 30 min bei + 20°C). Mit Dopamin und Octopamin wurde in denselben Konzentrationen keine sichere Wirkung beobachtet.

Der Einfluss der Reizbedingungen auf den initialen Abfall der Cochlearpotentiale bei totaler Ischämie

Die cochlearen Mikrophonpotentiale (CM) sinken bekanntlich nach Unterbrechung der Blut- bzw. Sauerstoffversorgung des Innenohres bis auf eine relativ kleine Fraktion ab, welche längere Zeit überlebt. Das Amplitudenverhältnis zwischen der letztgenannten Fraktion (CM_2) und den normalen Mikrophonpotentialen (CM_1) ist von der Intensität und Frequenz des Reiztones unabhängig[1]. Ob dies auch für die Steilheit des initialen Potentialabfalls der CM_1 gilt, wurde bisher nicht untersucht. Es ist lediglich bekannt, dass der Abfallsgradient eine unter gleichen Reizbedingungen weitgehend konstante Grösse darstellt, vorausgesetzt dass die Erstickung durch perakute totale Ischämie erzeugt wird[2] und unter konstanten Temperaturbedingungen erfolgt[3].

Die vorliegende Untersuchung wurde bei Meerschweinchen in Urethannarkose (2,0 g/kg Urethan intraperitoneal) durchgeführt. Bezüglich der Potentialableitung und -registrierung sowie der Technik einer temporären totalen Ischämie (Aortenkompression) wird auf eine frühere Veröffentlichung verwiesen[3]. Als Schallreize dienten reine Töne (Frequenz 2000–3000 Hz), deren Intensität noch im linearen Teil der CM-Charakteristik lag (70–75 db) oder aber maximal war (90–100 db). Die angegebenen Schallstärken beziehen sich auf die Schwelle des menschlichen Ohres. Die Darbietung erfolgte entweder kontinuierlich oder intermittierend (Reizton alle 15 s für je 2 s eingeschaltet). Ferner wurden in einigen Versuchen Clicks als zusätzliche oder ausschliessliche Schallreize verwendet (Rechteckimpulse von 0,1 ms Dauer und 5 s Intervall, Piezo-Schallgeber).

Die bei 3 Gruppen von je 6 Tieren durchgeführten Versuche mit perakuter totaler Ischämie ergaben für den initialen Abfall der CM_1 Halbwertszeiten (Mittelwert ± Standardabweichung) von 52 ± 5 s (Dauerton von 70 bis 75 db), 51 ± 7 s (intermittierender Ton von 70–75 db) und 53 ± 8 s (Dauerton von 90–100 db). In 5 weiteren Versuchen konnten mit Click-Reizen neurale Aktionspotentiale (AP) ausgelöst und auf Grund ihrer charakteristischen Eigenschaften (Verdeckung bzw. Desynchronisierung durch Rauschen, Polarität) verifiziert werden[4]. Bei perakuter totaler Ischämie sank das aus den synchronen Antworten zahlreicher neuraler Einheiten zusammengesetzte AP innerhalb von 18 ± 2 s auf den Halbwert seiner Amplitude ab, während die in 2 Fällen durch alternierende Reintondarbietung mitregistrierten CM_1 Halbwertszeiten von 45 bzw. 55 s aufwiesen. Damit werden frühere Beobachtungen[5] über eine höhere Anoxieempfindlichkeit der AP bestätigt und durch zahlenmässige Angaben ergänzt.

Hervorzuheben ist die Tatsache, dass die Halbwertszeit der CM_1 keiner nachweisbaren Beeinflussung durch Intensität und zeitliche Verteilung physiologischer Schallreize unterliegt. Da die Halbwertszeit des Potentialabfalls als Maßstab der Überlebenszeit gelten kann, sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine weitgehende Unabhängigkeit des Stoffwechsels der Potentialgeneratoren von der Reizenergie. Es erscheint in diesem Zusammenhang erwähnenswert, dass die von den äusseren Haarzellen des Cortischen Organs erzeugten CM_1 nach einer von DAVIS[6] postulierten Hypothese durch widerstandsbedingte Modulation eines präformierten Bestandpotentials entstehen.

F. KREJCI, R. THALMANN und H. BORNSCHEIN

Physiologisches Institut der Universität Wien und I. Universitätsklinik für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfkrankheiten Wien, 14. Dezember 1959.

Summary

The rapid initial drop of the cochlear microphonic potential following compression of the aorta was studied in guinea pigs. The intensity of the stimulus, either continuous or intermittent, was without influence on the halftime of amplitude ($t/_2 = 52 \pm 7$ s; $n = 18$). From this it is concluded that the metabolism of the generator responsible for the cochlear microphonic is unaffected by the type or intensity of stimulation. The lower resistance of the neural action potential to ischemia was confirmed ($t/_2 = 18 \pm 2$ s; $n = 5$).

[1] H. BORNSCHEIN und F. KREJCI, Mschr. Ohrenheilk. *83*, 190 (1949); Exper. *5*, 359 (1949). – E. G. WEVER, M. LAWRENCE, R. W. HEMPHILL und C. B. STRAUT, Amer. J. Physiol. *159*, 199 (1949).

[2] H. BORNSCHEIN und F. KREJCI, Exper. *6*, 271 (1950).

[3] H. BORNSCHEIN und F. KREJCI, Acta otolar. *45*, 467 (1955).

[4] W. A. ROSENBLITH und M. R. ROSENZWEIG, J. acoust. Soc. Amer. *23*, 583 (1951).

[5] H. BORNSCHEIN und B. GERNANDT, Acta physiol. scand. *21*, 82 (1950).

[6] H. DAVIS, Physiol. Rev. *37*, 1 (1957).

STUDIORUM PROGRESSUS

Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren

Von M. Brenner und A. Niederwieser*

Ismaĭlov und Shraĭber[1] haben wahrscheinlich als erste Stoffgemische auf dünnen Schichten von Adsorptionsmitteln chromatographiert. Sie arbeiteten mit losen Pulvern (CaO, MgO, Al_2O_3 usw.) auf Objektträgern und führten das jeweils verwendete Lösungsmittel tropfenweise zu. Williams[2] schützte die sehr empfindliche Schicht mit einer darüber gelegten zweiten Glasplatte und führte die mobile Phase durch ein Loch in der oberen Platte zu. Meinhard und Hall[3] verwendeten als Adsorptionsmittel ein Gemisch von Al_2O_3 und Celite und führten erstmals ein Bindemittel (Stärke) ein. Als Grundlage dienten Objektträger, auf welche das Adsorptionsgemisch als nasser Brei mit einem Spatel gestrichen wurde («Surface Chromatography»). Kirchner, Miller und Keller[4–6] gebrauchten statt dessen schmale Glasstreifen als Träger («Chromatostrips», 0,5 × 5,25 inches), die in Reagenzgläser gestellt wurden, welche die mobile Phase enthielten. Sie untersuchten zahlreiche Stoffe auf ihre Verwendbarkeit als Adsorptionsmittel für die Trennung von Terpenen, zum Beispiel MgO, Al_2O_3, Al_2O_3 mit SiO_2, SiO_2, CaO, Stärke und $MgCO_3$, fanden Al_2O_3 und SiO_2 am günstigsten und kamen davon ab, Celite beizumischen. Zum Sichtbarmachen der Flecken benutzten sie unter anderem H_2SO_4, konz. H_2SO_4–HNO_3 und den Brom-Fluoreszein-Test. Es ist das Verdienst von Stahl[7–11], der Methode die verdiente Beachtung verschafft zu haben. Er führte ein standardisiertes Adsorptionsmittel ein (Kieselgel G «Merck», mit etwas Gips als Bindemittel) und schuf ein brauchbares Streichgerät, mit dem gleichmässig dicke Adsorptionsschichten bereitet werden können. Damit war die Hauptschwierigkeit, die einer Verbreitung der Methode im Wege gestanden hatte, beseitigt.

Die ausserordentlichen Erfolge, die bei der Trennung lipophiler Stoffgemische mit der Dünnschicht-Chromatographie erzielt wurden[5,12–17], haben uns veranlasst, diese Methode auch an so hydrophilen Stoffen wie den Aminosäuren zu erproben. Ein solcher Versuch lag um so näher, als sich in der älteren Literatur eine ganze Anzahl von Angaben über säulenchromatographische Aminosäuren-Trennungen an anorganischen Adsorbentien finden[18]. Diese Trennungsverfahren gerieten in Vergessenheit, weil sie infolge eines unverhältnismässig grossen Bedarfs an Adsorptionsmitteln umständlich waren und andere Methoden (Ionenaustauscher, Papierchromatographie) bequemer erschienen. Tatsächlich ist auch bei der Papierchromatographie das Verhältnis Adsorbens zu Adsorbat sehr gross: es beträgt zum Beispiel bei zweidimensionaler Chromatographie von 450 µg Aminosäuren-Mischung auf einem Bogen von 32 × 32 cm Whatman-Papier Nr. 1 (Gewicht 9 g) 20000:1! Dies wirkt nur deshalb nicht störend, weil die der Papierchromatographie eigene Technik kurze Laufzeiten gewährleistet und die Elution entweder auf einen kleinen Teil des Adsorbens beschränkt oder überhaupt erübrigt.

Genau dasselbe gilt nun für die Platten-Chromatographie. Beim Übergang von der Adsorptionssäule zur Adsorptionsschicht durfte man deshalb erwarten, dass die Nachteile der anorganischen Adsorbentien verschwinden würden. In der Tat berichten Mutschler und Rochelmeyer[19] über eine sehr erfolgreiche Trennung von 14 Aminosäuren an gepuffertem Kieselgel in 70% EtOH (1. Dimension) und EtOH/NH_3 (2. Dimension). Wir haben die Angaben dieser Autoren nachgearbeitet und können ihre Resultate unter gewissen Vorbehalten bestätigen. Zunächst zeigte es sich nämlich, dass noch mehr als bei der Papierchromatographie eine gewisse Unsicherheit in bezug auf die Reproduzierbarkeit von R_f-Werten besteht. Unter unseren Arbeitsbedingungen zum Beispiel laufen sämtliche Aminosäuren langsamer als bei Mutschler und Rochelmeyer. Dies kann mit dem Trocknungsgrad der Platte, der schwer zu definieren ist, und mit dem Sättigungsgrad der Gasatmosphäre in der Trennkammer zusammenhängen. Im übrigen ist die nach Mutschler und Rochelmeyer erforderliche Pufferung überflüssig und unter Umständen sogar nachteilig.

Wir beschreiben im folgenden unsere Arbeitsweise und fügen einige Resultate bei, welche die Leistungsfähigkeit der Methode illustrieren und die Angaben von Mutschler und Rochelmeyer ergänzen.

1. *Lösungsmittelsysteme.* Die bei papierchromatographischen Aminosäuren-Trennungen gebräuchlichen einphasigen Systeme, welche durch einfaches Mischen der Komponenten im angegebenen *Gewichtsverhältnis* bereitet werden, eignen sich auch hier. Wir haben im besonderen gute Erfahrungen gemacht mit:
Alkohol 96%-Wasser (63:37), *n*-Propanol-Wasser (64:36), *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (60:20:20), Phenol-Wasser (75:25)[20], *n*-Propanol-Ammoniak 34% (67:33), Alkohol 96%-Ammoniak 34% (77:23).

In Systemen mit viel Methanol, Äthanol oder Azeton erzielt man oft gute Trenneffekte, erhält aber immer relativ verschwommene Flecken. Wie man aus den sehr aufschlussreichen Abbildungen 1a), b), c) ersieht, ist der allgemeine Trenneffekt von *n*-BuOH-AcOH-H_2O und Phenol-Wasser weitaus am besten. Dementsprechend ist für zweidimensionale Chromatogramme die Kombination von *n*-BuOH-AcOH-H_2O mit Phenol-Wasser besonders empfehlenswert.

2. *Herstellung der Platten*[21]. Das Kieselgel G[22] (25 g) wird mit Wasser (50 ml) in einem verschlossenen Erlenmeyer-Kolben (200 ml) 30 sec lang sehr kräftig geschüttelt, die Suspension sofort in das bereitgestellte Streichgerät gegossen und dieses vorsichtig über die entfetteten Glasplatten geführt. Es empfiehlt sich nicht, die entstandene

* Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel. 9. Juni 1960.

[1] N. A. Ismaĭlov und M. S. Shraĭber, Farmatsija *1938*, Nr. 3, 1.

[2] T. I. Williams *Introduction to Chromatography* (Blackie and Son, Glasgow 1947), p. 36.

[3] J. E. Meinhard und N. F. Hall, Anal. Chem. *21*, 185 (1948).

[4] J. G. Kirchner, J. M. Miller und G. J. Keller, Anal. Chem. *23*, 420 (1953).

[5] J. M. Miller und J. G. Kirchner, Anal. Chem. *25*, 1107 (1953).

[6] J. M. Miller und J. G. Kirchner, Anal. Chem. *26*, 2002 (1954).

[7] E. Stahl, Pharmazie *11*, 633 (1956).

[8] E. Stahl, Chemikerztg. *82*, 323 (1958).

[9] E. Stahl, Parfümerie und Kosmetik *39*, 564 (1958).

[10] E. Stahl, Arch. Pharm., Berlin *292/64*, 411 (1959).

[11] E. Stahl, Pharm. Rdsch. *1959*, Heft 2, 1.

[12] R. H. Reitsema, Anal. Chem. *26*, 960 (1954).

[13] L. H. Bryant, Nature *175*, 556 (1955).

[14] R. A. Bernhard, Nature *182*, 1171 (1958).

[15] H. Rochelmeyer, Pharm. Ztg. *103*, 1269 (1958).

[16] M. Barbier, H. Jäger, H. Tobias und E. Wyss, Helv. chim. Acta *42*, 2440 (1959).

[17] A. Seher, Fette, Seifen, Anstrichmittel *61*, 345 (1959).

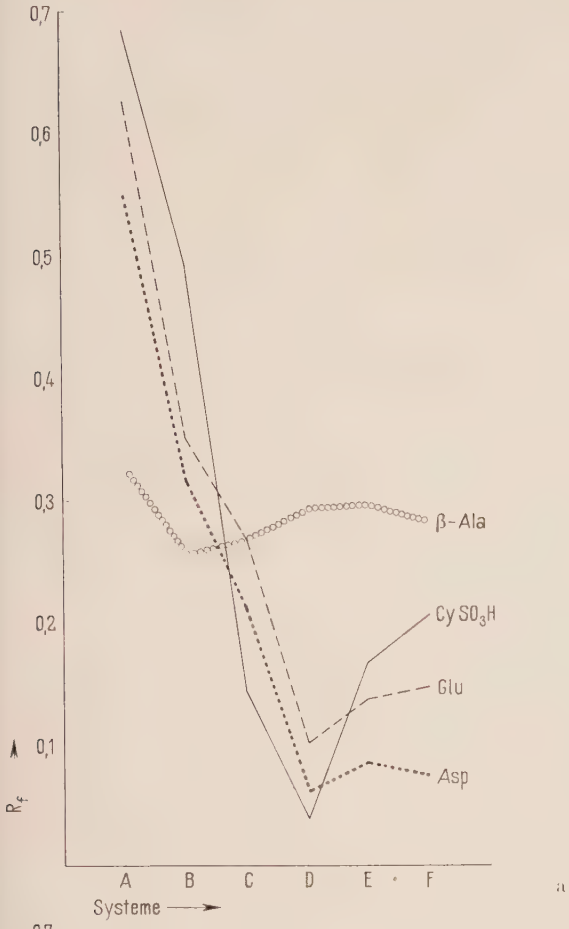
[18] Vgl. die Zusammenstellung bei A. J. P. Martin und R. L. M. Synge, Adv. Prot. Chem. *2*, 1 (1945).

[19] E. Mutschler und H. Rochelmeyer, Arch. Pharm. Berlin *292/64*, 449 (1959).

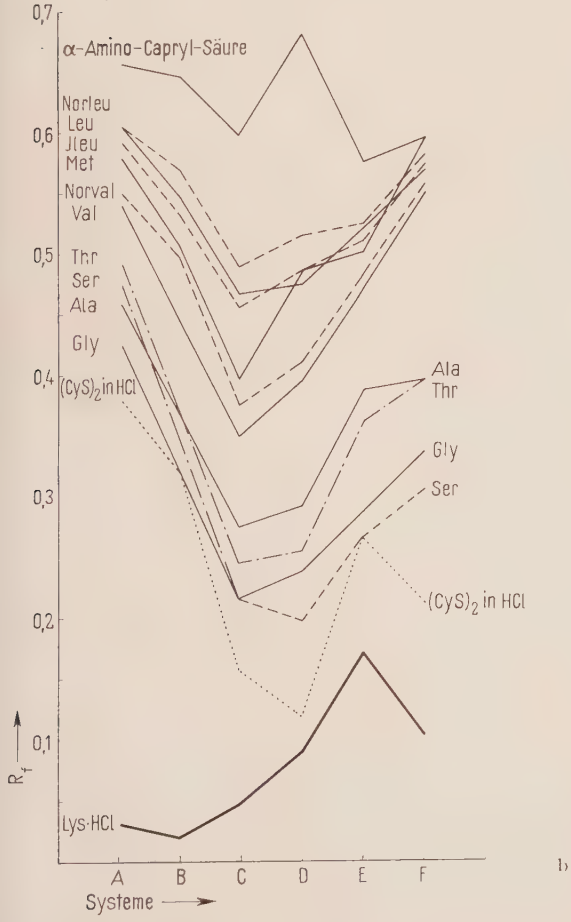
[20] Zu 100 g Mischung gibt man etwa 20 mg NaCN.

[21] Glasplatten und Geräte stammen von der Firma C. Desaga, Heidelberg.

[22] Kieselgel G «Merck» für Dünnschichtchromatographie nach Stahl.



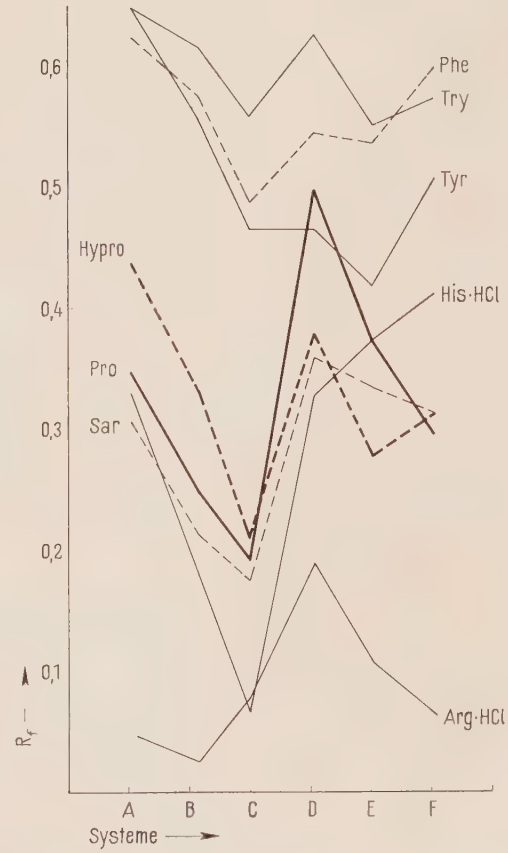
a



b

Schicht mit dem Föhn vorzutrocknen, da aus Unachtsamkeit durch den kräftigen Luftstrom leicht Unebenheiten in der anfangs noch leicht beweglichen Schicht entstehen können. Ratsam ist es, die Platten mindestens solange unberührt liegen zu lassen, bis ihre Oberfläche völlig matt geworden ist (etwa 10 min). Am besten lässt man sie einfach über Nacht an der Luft trocknen, wobei eine besonders fest haftende Schicht entsteht. Man kann sie auch etwa 15 min lang bei 110°C trocknen, muss sie dann aber nach dem Abkühlen noch mindestens $^1/_2$ h frei an der Luft liegen lassen. Vor Gebrauch wird die Schicht an den Rändern zur Sicherstellung einer scharfen Begrenzung jeweils etwa 2 mm breit mit Daumen und Zeigefinger abgestreift.

3. *Auftragen der Substanz-Proben.* Die Startpunkte liegen 1,5 cm vom Plattenrand entfernt und werden durch sehr kleine Einstiche mit einem spitzen Bleistift markiert. Bei kleiner aufgetragener Menge sind gegenseitige Abstände von nur 0,8 cm zulässig. Auf einer 20 × 20-cm-Platte finden also in solchen Fällen über 20 Proben Platz. Pro Aminosäure sollen 0,1–10 µg, besser aber 1–5 µg aufgetragen werden, und zwar auf möglichst kleiner Fläche. Es darf höchstens 1 mm^3 Flüssigkeit auf einmal aufgetragen werden, besser nur $^1/_3$ mm^3. Man benötigt nach einiger Übung keine geeichten Spezialpipetten mehr, sondern kann selbst gezogene Kapillaren verwenden und das aufgetragene Volumen an der benetzten Fläche abschätzen.



c

Abb. 1. a), b), c) Graphische Darstellung der Trenneffekte einiger Lösungsmittelsysteme. A = EtOH 96%-H_2O (63:37). B = *n*-PrOH-H_2O (64:36). C = *n*-BuOH-AcOH-H_2O (60:20:20). D = Phenol-H_2O (75:25). E = *n*-PrOH-NH_3 34% (67:33). F = EtOH 96%-NH_3 34% (77:23).

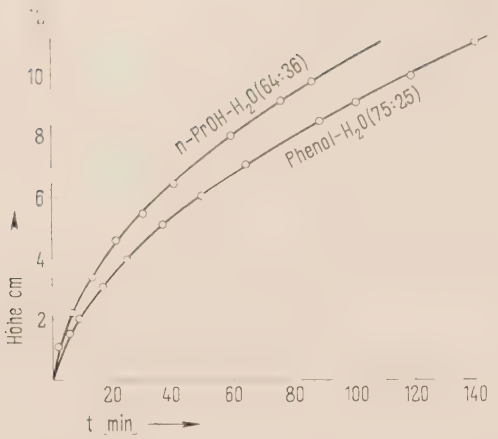


Abb. 2. Laufstrecke als Funktion der Versuchsdauer bei grosser und bei kleiner Viskosität der mobilen Phase.

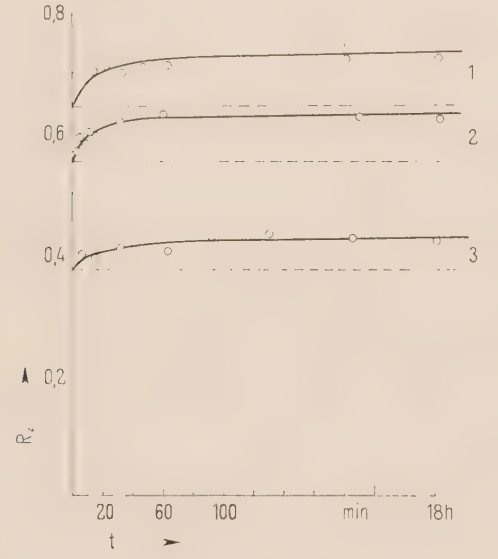


Abb. 3. Zeitliche Änderung von R_f-Werten bei erzwungenem Stillstand der Lösungsmittelfront.

Laufstrecke 10 cm, Stillstand der Front zur Zeit $t = 0$. 1: α-Aminocaprylsäure in n-PrOH-H_2O (64:36). 2: Try in n-BuOH-AcOH-H_2O (60:20:20). 3: Hypro in Phenol-H_2O (75:25).

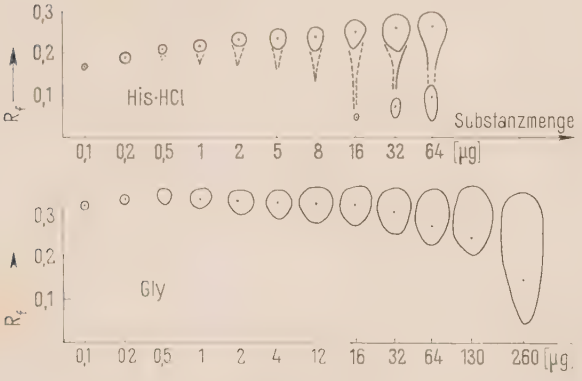


Abb. 4. Abhängigkeit der R_f-Werte von der Substanzmenge bei His·HCl und Gly.

Die Orte höchster Substanzkonzentration sind durch Punkte markiert. Die angegebenen Mengen (in µg) wurden in je 1 mm³ Lösung aufgetragen. System: n-PrOH-H_2O (64:36).

Ist die Konzentration der verwendeten Lösung zu gering, so muss man natürlich wie bei der Papierchromatographie den beim ersten Tüpfeln entstandenen Fleck trocknen lassen, bevor man nochmals auf die gleiche Stelle aufträgt. Bei den geringen Flüssigkeitsmengen geht das so rasch, dass man keinen Föhn zu Hilfe nehmen muss.

4. *Trennung.* a) Als *Laufstrecke* genügen gewöhnlich 10 cm. Mit längeren Strecken lässt sich der Trenneffekt grundsätzlich verbessern. Dies lohnt sich aber kaum, denn die Versuchsdauer wird grösser (Abb. 2), der Diffusionseffekt deutlicher und die Empfindlichkeit kleiner. Eine der gewählten Laufstrecke entsprechende Grenzlinie kann im voraus mit dem Bleistift quer durch die Platte gezogen werden. Der dabei entstehende Staub muss weggeblasen werden. Obwohl die mobile Phase nur bis zu dieser Grenzlinie steigen kann, sollen die Platten unmittelbar nach Erreichen der Grenzlinie aus der Trennkammer herausgenommen werden[23]. Nur so erhält man sowohl reproduzierbare R_f-Werte (Schwankung $\pm$ 0,05) als auch minimalen Fleckendurchmesser. Wie man mit blossem Auge sieht, ist in der Kieselgel-Schicht die Konzentration der Flüssigkeit in der Nähe der Front sehr viel kleiner als weiter unten[24]. Der Flüssigkeitsstrom von unten nach oben hört deshalb nicht sofort auf, wenn die mobile Phase die obere Schichtgrenze erreicht hat. Das heisst, dass auch nach dem Stillstand der Front die Substanzen noch eine Weile weiter wandern (Abb. 3), wodurch die R_f-Werte um etwa 10% zunehmen (R_f-Endwert $\sim 1{,}1 \cdot R_f$). Die Schwankungsbreite beim R_f-Endwert ist kleiner als beim R_f-Wert. Trotzdem ziehen wir für praktische Belange den R_f-Wert vor, weil man ihn ohne Zeitverlust ermitteln kann und weil die Fleckengrösse während der Zeit, die bis zur Erreichung des Endwertes verstreicht (15–60 min je nach System), infolge der Diffusion merklich zunehmen kann. Chromatographiert man mehrere Platten gleichzeitig, so empfiehlt es sich, nur die vorderste, am besten sichtbare Platte mit der 10-cm-Grenzlinie zu versehen. Das Lösungsmittel läuft nämlich nicht überall gleich schnell, so dass es, weil die Trennkammer erst nach Beendigung des Versuchs geöffnet werden darf, unmöglich wird, jede Platte im richtigen Moment herauszunehmen. Man richtet deshalb die Versuchsdauer nach der Steiggeschwindigkeit auf der vordersten Platte und markiert die Front auf den anderen Platten unmittelbar nach Öffnen der Kammer.

b) Die *R_f-Werte* sind, wie Abbildung 4 zeigt, von der Konzentration abhängig. Die Änderungen sind aber bei mittleren Konzentrationen zu vernachlässigen. Die Flekkengrösse ist natürlich auch konzentrationsabhängig, und zwar findet man in einem mittleren Konzentrationsbereich die aus der Papierchromatographie[25,26] bekannte Proportionalität zwischen der Fleckenfläche und dem log der Substanzmenge (Abb. 5). Im übrigen können sich die R_f-Werte bei Anwesenheit von Fremdstoffen geringfügig ändern. So nehmen zum Beispiel die R_f-Werte der sauren Aminosäuren im System 70% n-PrOH zu, wenn sie in Mischung mit anderen Aminosäuren vorliegen. Bemerkenswert ist die Höhe der R_f-Werte von $CySO_3H$, Asp und Glu in neutralen Systemen (vgl. Abb. 1a).

Wie bei der Papierchromatographie sind jedoch die R_f-Wertverhältnisse ziemlich konstant. Es ist also bei einem Aminosäuren-Gemisch weniger der einzelne R_f-Wert als das Fleckenmuster für die Identifizierung massgebend.

[23] J. Demole, J. Chromatogr. *1*, 30 (1958).

[24] Vgl. dazu die rechnerischen Betrachtungen über die Flüssigkeitsverteilung auf Papierchromatogrammen bei J. C. Giddings, G. H. Stewart und A. L. Ruoff, J. Chromatogr. *3*, 239 (1960).

[25] R. B. Fisher und R. Holmes, Biochem. J. *44*, liv (1949).

[26] R. B. Fisher, D. S. Parson und G. A. Morrison, Nature *161*, 764 (1948).

Abb. 5. Beziehung zwischen Substanzmenge und Fleckenfläche bei Glycin (vgl. Abb. 4).

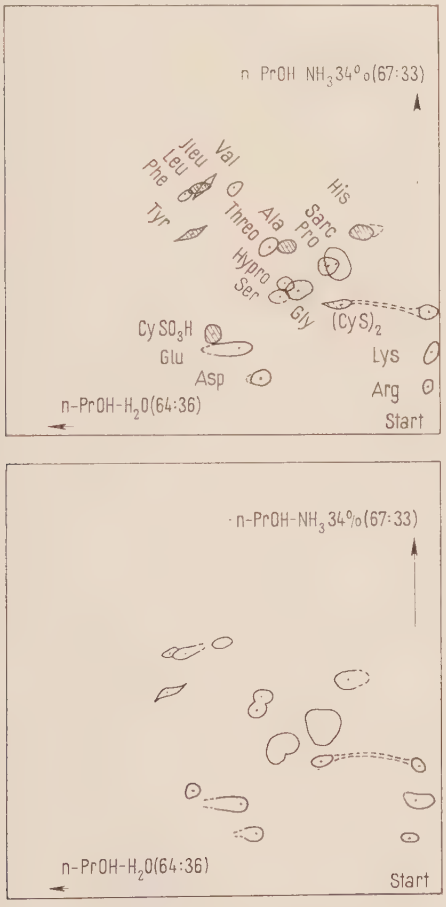


Abb. 6. Reproduzierbarkeit von Fleckenmustern. *Oben.* Chromatogramme A und B aufeinanderkopiert. A (schraffiert): zweidimensionales Chromatogramm von Leu, Tyr, Ala, Pro, Gly, $CySO_3H$, His·HCl $(CyS)_2$. B: zweidimensionales Chromatogramm von Phe, Ileu, Val, Thr, Hypro, Ser, Sar, Glu, Asp, Lys·HCl, Arg·HCl. *Unten.* Die Substanzen von A und B gemeinsam zweidenimsional chromatographiert. Beladung oben und unten: je 1 µg pro Aminosäure.

Um die Reproduzierbarkeit der Muster zu prüfen, wurden zwei Aminosäuren-Mischungen A und B zunächst einzeln und dann gemeinsam zweidimensional chromatographiert. Kopiert man die beiden Chromatogramme von A und B aufeinander, so erhält man annähernd dasselbe Muster, wie wenn man A und B gemeinsam chromatographiert (Abb. 6).

Zur Orientierung geben wir nachstehend eine Zusammenstellung von R_f-Werten (Tab.). Angegeben ist das arithmetische Mittel aus jeweils mindestens drei Einzelbestimmungen, die auf Platten durchgeführt wurden, wie sie oben beschrieben sind. Verändert man vor dem Gebrauch die Qualität der Platten (Trocknen, Befeuchten, Lösungsmittel-Vorbehandlung[27]), so ergeben sich geringfügige R_f-Wertverschiebungen; dasselbe gilt natürlich für zweidimensionale Chromatogramme, wo das 1. Lösungsmittel das Verhalten der Platte gegenüber dem 2. Lösungsmittel beeinflussen kann. Da diese Änderungen geringfügig und von Fall zu Fall verschieden sind, lohnt es sich nicht, im einzelnen darauf einzugehen.

c) In die *Trennkammer* wird soviel mobile Phase gegeben, dass die Platten etwa 0,5 cm tief in die Flüssigkeit tauchen. Die Wände werden bis auf einen schmalen Spalt

R_f-Werte[a] einiger Aminosäuren

	A	B	C	D	E	F
α-Aminocaprylsäure	66	65	60	69	58	60
Try	65	62	56	63	55	58
Phe	63	58	49	55	54	60
Norleu	61	57	49	52	53	59
Leu	61	55	47	48	53	58
Ileu	60	53	46	49	52	58
Tyr	65	57	47	47	42	51
Dioxyphenylalanin	—	—	45	34	—	—
Met	59	51	40	49	51	60
Norval	56	50	38	42	49	57
Val	55	45	35	40	48	56
Ala	47	37	27	29	39	40
β-Ala	33	26	27	30	30	29
Thr	50	37	25	26	37	40
Ser	48	35	22	20	27	31
Gly	43	32	22	24	29	34
Hypro	44	34	20	38	28	31
Pro	35	26	19	50	37	30
Sar	31	22	17	37	34	31
$CySO_3H$	69	50	14	04	17	21
Glu	63	35	27	10	14	15
Asp	55	33	21	06	09	07
His · HCl	33	20	06	32	38	42
Lys · HCl	03	02	05	09	18	11
Arg · HCl	04	02	08	19	10	06
$(CyS)_2$[b]	39	32	16	12	27	22

[a] Angegeben ist $R_f \cdot 100$. [b] Gelöst in 0,5 *N* HCl.

A = EtOH 96%-H_2O (63:37). B = *n*-PrOH-H_2O (64:36). C = *n*-BuOH-AcOH-H_2O (60:20:20). D = Phenol-H_2O (75:25). E = *n*-PrOH-NH_3 34% (67:33). F = EtOH 96%-NH_3 34% (77:23). Angegeben sind *Gewichtsverhältnisse*.

[27] Stahl berichtet, dass Platten, die sich in der Trennkammer wie beim Chromatographieren mit Benzol vollgesogen haben, nach Verdunsten des Benzols bei der nachfolgenden Verwendung zur Chromatographie sich etwas anders verhalten als Platten, die nicht in der angegebenen Weise vorbehandelt wurden. Stahl führt dies auf unterschiedlichen Wassergehalt der Schichten zurück.

mit Filterpapier ausgeschlagen, welches ebenfalls in die mobile Phase taucht[10]. Es ist gut, einige Male kräftig zu schütteln und dann noch 10 min zu warten, worauf die Platten rasch hineingestellt werden, und zwar möglichst ohne Luftzug. Man kann in eine Trennkammer mehrere Platten hineinstellen, muss aber darauf achten, dass sie sich namentlich unten nicht zu nahe kommen, weil sonst zwischen den Platten infolge der Kapillarität mobile Phase hochsteigen kann. Ferner ist es bei kleinen Plattenabständen (0,5–1 cm) sehr wichtig, ein Stück Filterpapier mit der mobilen Phase zu tränken und so auf die Rückseite der Platte zu kleben, dass es unten in die Flüssigkeit taucht. Diese Anordnung garantiert einen korrekten Frontverlauf auf der benachbarten Platte (Sättigung der Gasphase). Zur gegenseitigen Fixierung der Platten verwenden wir einen Halter, den man sich leicht selber aus einem dünnen Glasstab herstellen kann (Abb. 7). Als Trennkammern für schmale Platten (zum Beispiel 5 × 20 cm) können Sterilisiergläser geeigneter Grösse (zum Beispiel 2 l) benutzt werden.

5. *Entwickeln der Chromatogramme.* Die Platten werden zunächst etwa 10 min bei 110°C getrocknet und dann vorteilhaft mit dem von Moffat und Lytle[28] modifizierten Ninhydrin-Reagens vorsichtig besprüht.

Reagens. Lösung I: 50 ml 0,2% Ninhydrin-Lösung in EtOH abs, 10 ml AcOH, 2 ml 2,4,6-Kollidin. Lösung II: 1% $Cu(NO_3)_2 \cdot 3\,H_2O$-Lösung in EtOH abs. Erst kurz vor Gebrauch wird Lösung I mit II im Verhältnis 50:3 gemischt.

Man hält die besprühte Platte über eine heisse Kochplatte, bis die Farbentwicklung eben einsetzt. Im durchscheinenden Licht erkennt man, wie sich auf der warmen Platte die Farbflecke allmählich vertiefen. Einige Aminosäuren kommen so fast punktförmig zum Vorschein und werden rasch durch Einstiche mit einem spitzen Bleistift markiert. Auf diese Art wird es oft möglich, in Flecken, die nachher zusammenfliessen, die einzelnen Komponenten zu erkennen. Die Aminosäuren unterscheiden sich auch in der Geschwindigkeit, mit welcher sie Farbstoffe bilden (zum Beispiel erscheint Sarcosin erst spät und gibt dann rasch einen relativ grossen Flecken). Trotz dieser günstigen Verhältnisse gibt es Mischungen (zum Beispiel Phe, Leu, Ileu, Ser, Hypro, Gly), bei denen sich nicht alle Komponenten mit Sicherheit unterscheiden lassen.

6. *Zusammenstellung der Ergebnisse.* In Abbildungen und Tabellen werden dargestellt:

Tabelle: R_f-Werte.

Abb. 1a), b), c): Graphische Darstellung der Trenneffekte einiger gebräuchlicher Lösungsmittel-Systeme.

Abb. 2: Laufstrecke als Funktion der Versuchsdauer bei grosser und bei kleiner Viskosität der mobilen Phase.

Abb. 3: Zeitliche Änderung von R_f-Werten bei erzwungenem Stillstand der Lösungsmittelfront (Laufstrecke 10 cm, Stillstand der Front zur Zeit $t = 0$).

Abb. 4: Abhängigkeit der R_f-Werte von der Substanzmenge bei His·HCl und Gly (n-PrOH-H_2O).

Abb. 5: Beziehung zwischen Substanzmenge und Flekkenfläche bei Glycin (n-PrOH-H_2O).

Abb. 6: Reproduzierbarkeit von Fleckenmustern.

Abb. 7: Trennkammer mit eingestellten Platten und selbstverfertigtem Plattenhalter (Glasstab).

Abb. 8: Vergleich von Papierchromatographie mit Dünnschicht-Chromatographie (zweidimensionale Chromatogramme in Originalgrösse ×0.57).

7. *Schlussfolgerung.* Bei der Trennung von Aminosäuren-Gemischen ist die Dünnschicht-Chromatographie der Papier-Chromatographie ebenbürtig oder sogar überlegen. Ihr Hauptvorteil gegenüber der Papier-Chromatographie beruht auf einer Verminderung der Diffusions-Erscheinungen. Dies bedeutet:

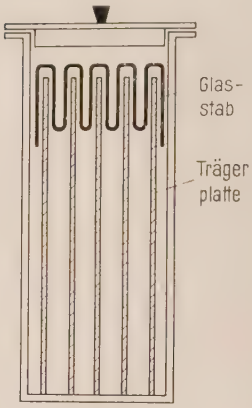


Abb. 7. Trennkammer mit eingestellten Platten und selbstverfertigtem Plattenhalter (Glasstab).

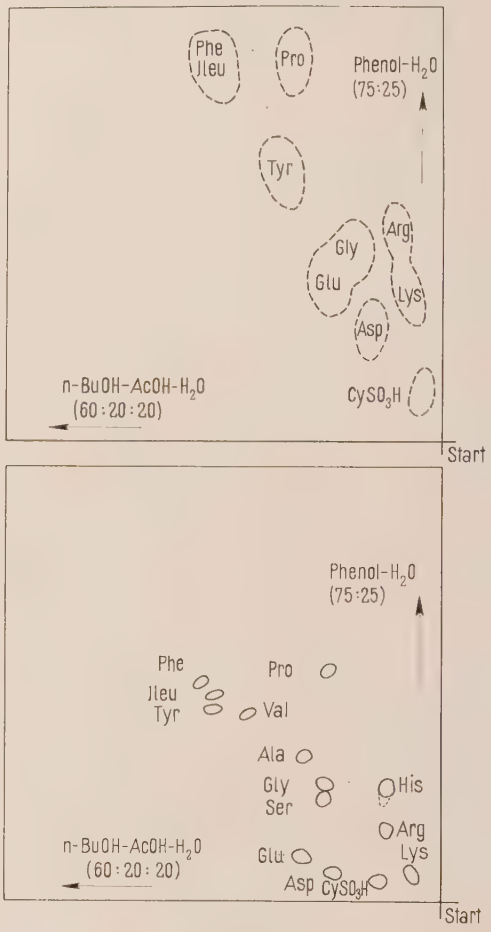


Abb. 8. Vergleich von Papierchromatographie mit Dünnschicht-Chromatographie. Zweidimensionale Chromatogramme in Originalgrösse ×0.57.

Oben. 10 Aminosäuren auf Whatman-Papier Nr. 1. Laufzeit etwa 2 und $2^1/_2$ h. *Unten.* 14 Aminosäuren auf Kieselgel G. Laufzeit etwa $1^1/_2$ und 2 h. Beladung: 1 mm^3 wässerige Lösung, enthaltend 1 µg von jeder Aminosäure.

[28] E. D. Moffat und R. I. Lytle, Analyt. Chem. *31*, 926 (1959).

Anmerkung bei der Korrektur. Leider wurden die beiden folgenden Arbeiten übersehen: E. Nürnberg, Arch. d. Pharm. *292/64* 610 (1959). M. Mottier, Mitt. a. d. Gebiet d. Lebensmittelunters. u. Hygiene *49*, 454 (1958).

a) eine Erhöhung der Empfindlichkeit um etwa einen Faktor 10, weil die Fleckenausdehnung während der Wanderung auch bei vergleichbaren Laufzeiten geringer ist als bei der Papier-Chromatographie (Abb. 8);

b) eine Verkürzung der benötigten Trennstrecke und damit einen Zeitgewinn. Weil die Steiggeschwindigkeit der mobilen Phase zu Beginn am grössten ist, ist dieser Zeitgewinn grösser als es die Streckenverkürzung allein erwarten liesse (Dauer für zweidimensionale Chromatogramme 4–5 h statt 2–3 Tage bei Papier-Chromatogrammen).

Bewährt hat sich das von MOFFA T und LYTLE[28] modifizierte Ninhydrin-Reagens, mit welchem die einzelnen Aminosäuren in charakteristischen Farben erscheinen.

Summary

Amino acid separation with 6 different solvents on chromatoplates prepared from Kieselgel G ('Merck') is described. As demonstrated in Figur 8 and discussed in the text, this technique is equal or superior to paper chromatography.

ARS EXCERPENDI

« Codeless Scanning », ein neues Verfahren der automatischen Dokumentation

ROCHE gibt seit 1920, anfänglich allein und seit etwa 2 Jahren in Arbeitsgemeinschaft mit SANDOZ, eine betriebsinterne Literaturübersicht heraus, in der gegenwärtig ungefähr 400 der wichtigsten chemischen, medizinischen pharmakologischen und pharmazeutischen Zeitschriften referiert werden. Diese Literaturübersicht ermöglicht, gleichzeitig die Aufgabe der Information und der Dokumentation zu lösen. Sie enthält Auszüge aus der publizierten Literatur in Form von Referaten, wobei jedes Referat neben einer kurzen Wiedergabe des wesentlichen Inhalts einer Publikation die Namen der Autoren, den Titel in der Originalsprache, das Literaturzitat und als Hauptmerkmal die wichtigsten Aussagen in Stichwörtern umfasst. Die für eine Arbeit zutreffenden Stichwörter werden einer verbindlichen Liste entnommen und schliessen damit die Schwierigkeiten aus, die durch Synonyma entstehen können. Sämtliche Stichwörter werden in Form einer Kartothek laufend nachgeführt und bilden ein Register mit Kreuzverweisen. Obschon sich diese konventionelle Arbeitsweise durchaus bewährt hat, führt der grosse Anfall von Referaten (mehr als 20000 pro Jahr) zu zunehmenden Schwierigkeiten in der Bewältigung der Arbeitslast, was sich als Verzögerung der Berichterstattung störend auswirken kann. Dieses starke Anwachsen der Literatur veranlasste uns, ein neuartiges mechanisches Dokumentationsverfahren, das von uns als «Codeless Scanning» bezeichnet wird, auszuarbeiten. Die für unser Verfahren charakteristischen Merkmale sind nachstehend kurz beschrieben:

1. Es wurde eine verbindliche Stichwörterliste aufgestellt, die alle Belange der zu bearbeitenden Sachgebiete genügend umfasst. Nicht nur die Naturwissenschaften und die Medizin, sondern alle Wissensgebiete können durch ein geeignetes Stichwörterrepertoire unserer Methode zugänglich gemacht werden. Das Stichwörtersystem hat zudem den Vorteil, dass jederzeit neue, durch die Fortschritte der Wissenschaft notwendig gewordenen Ausdrücke zugefügt werden können, ohne dass Änderungen des Systems notwendig werden.

2. Die Literaturreferate werden auf Friden-Flexowriter-Maschinen geschrieben, die gleichzeitig eine für die mechanische Vervielfältigung geeignete Vorlage in Klarschrift und einen Lochstreifen für die mechanische und automatische Rückinterpretation des gleichen Textes liefern.

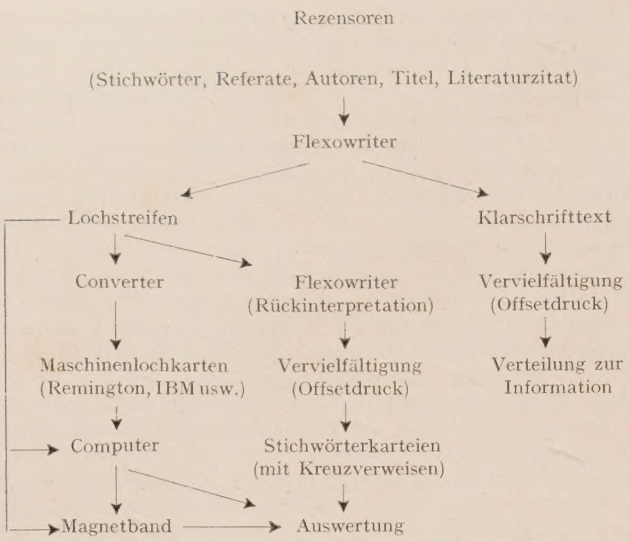
3. Der Lochstreifen dient einmal zur automatischen Niederschrift der Stichwörterkartothek, wobei sich eine Reduktion der Arbeit um etwa 70% erzielen lässt und gleichzeitig ein Hineinbringen von Tippfehlern vermieden wird. Diese Stichwörterkartothek bleibt nach wie vor ein wesentlicher Bestandteil unseres Dokumentationssystems, da sie ein billiges und rationelles Hilfsmittel für einfachere Literaturrecherchen darstellt.

4. Zum andern dient der gleiche Lochstreifen zur automatischen Herstellung von Lochkarten im «Tape-to-card»-Converter, wobei der Lochstreifen für die verschiedenen Maschinenlochkartentypen, zum Beispiel IBM, Remington, Samas usw., verwendet werden kann und einen Austausch des Dokumentationsmaterials zwischen verschiedenen Firmen ermöglicht. Ausserdem können bei entsprechend ausgerüsteten Computern die Lochstreifen direkt ohne Umwandlung eingelesen werden.

5. Die maschinelle Durchführung von umfassenden Literaturrecherchen nach dem «Codeless Scanning»-Verfahren erfolgt auf elektronischen Rechengeräten wie Remington UCT, IBM 1401 und andern, die eine Recherche gleichzeitig nach mehreren gemeinsam vorkommenden Stichwörtern erlauben. Falls die Ansprüche an die Geschwindigkeit nicht allzuhoch sind, können auch wesentlich billigere Kleincomputer wie Bendix G-15, Zuse Z22R und andere eingesetzt werden. Die Maschinen vergleichen das in Form von Lochstreifen, Lochkarten oder Magnetbändern vorliegende Material Wort für Wort mit den auf Suchkarten gelochten zu selektionierenden Begriffen. Sobald ein Suchwort mit dem Stichwort eines Referates übereinstimmt, wird der ganze Text nach dem zweiten, dritten usw. Begriff abgesucht. Treffen die geforderten Bedingungen zu, so werden die gesamten, gespeicherten Angaben des betreffenden Referates auf dem angeschlossenen Schnelldrucker herausgeschrieben. Auf diese Weise erhält man als Ergebnis der Recherche direkt und ohne weiteren Aufwand eine gedruckte Liste, die die Gesamtheit der Stichwörter, Autoren, Titel und bibliographischen Daten enthält. Der ganze Vorgang läuft ab, ohne dass die ursprüngliche Reihenfolge der Lochkarten verändert wird. Damit wird das zeitraubende Rücksortieren der Karten hinfällig.

6. Schliesslich bietet die beschriebene «Codeless Scanning»-Methode eine gute Grundlage für eine Zusammenarbeit, wie sie bereits zwischen den Firmen ROCHE und SANDOZ besteht. Referate, Stichwörter-Kartei und Flexowriter-Lochstreifen werden zwischen den Firmen ausgetauscht, jede Firma wandelt die Lochstreifen gemäss ihrer maschinellen Anlage in Lochkarten oder Magnetbänder um. Ausserdem können die Lochstreifen auch zur Herstellung von Lochkarten für andere Dokumentationsverfahren wie das «L'Unité»-System verwendet werden. Eine Zusammenarbeit ist auch zwischen Firmen möglich, die keine geeignete Maschinenanlage besitzen. Die Recherchen können in bestehenden neutralen Rechenzentren oder mit Hilfe der Stichwörterkartothek durchgeführt werden.

Schematisch vollzieht sich der Ablauf der gesamten Dokumentationsarbeit nach dem «Codeless-Scanning»-Verfahren wie folgt:



Das geschilderte «Codeless-Scanning»-Verfahren bietet gegenüber bisher bekannten Methoden der automatischen Literaturrecherche folgende Vorteile:

1. Ausschliesslich Verwendung von Stichwörtern mit direktem Aussagewert an Stelle von Zahlen-, Zahlen-Buchstaben- oder koordinativen Schlüsseln, die stets eine stark ins Gewicht fallende Mehrarbeit erfordern.
2. Die Erweiterung des Stichwortsystems entsprechend den Fortschritten der Wissenschaft kann ohne Schwierigkeiten jederzeit erfolgen.
3. Die Zahl der Stichwörter pro Referat unterliegt praktisch keiner Beschränkung.
4. Die Kontrolle der Stichwörter auf Fehlerlosigkeit ist praktisch gut durchführbar.
5. Grosse Differenzierbarkeit der Stichwörter und Wegfall von Koinzidenzen.
6. Direkte Rückinterpretation eines vollständigen Texts in Klarschrift (ohne Umweg über die Rückübersetzung eines Codes oder Schlüssels).
7. Die meisten Maschinenlochkartensysteme können in ihrer handelsüblichen Ausrüstung verwendet werden.
8. Die Zusammenarbeit mehrerer Dokumentationsstellen ist rationell gelöst.
9. Alle Arbeiten mit Ausnahme der Rezension der Literatur und der Wahl der Stichwörter können von Hilfskräften ausgeführt werden.

F. Wegmüller, R. Becher,
B. Hoffmann und H. R. Schenk

F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Literaturabteilung und Lochkartenabteilung, Basel, und Sandoz AG., Dokumentations- und Literaturstelle der pharmazeutischen Abteilung, Basel, 4. Mai 1960.

Summary

'Codeless Scanning' is a new documentation system using exclusively plain language and precisely defined key-words for mechanical information retrieval. It can be applied over the whole range of science and enables the co-operation between different documentation departments.

CONGRESSUS

Pays-Bas

5e Congrès Européen pour la spectroscopie moléculaire

Amsterdam, le 29 mai au 3 juin 1961

Le 5e Congrès Européen pour la spectroscopie moléculaire aura lieu à Amsterdam du 29 mai au 3 juin 1961.
Pour tous renseignements concernant le congrès on est prié de s'adresser à D. H. Zijp, secrétaire du comité, Laboratoire de Chimie inorganique, Nieuwe Achtergracht 123, Amsterdam (Pays-Bas).

France

Onzième Réunion annuelle de la Société de Chimie Physique

Col de Voza (Haute-Savoie),
26 au 30 juin 1961

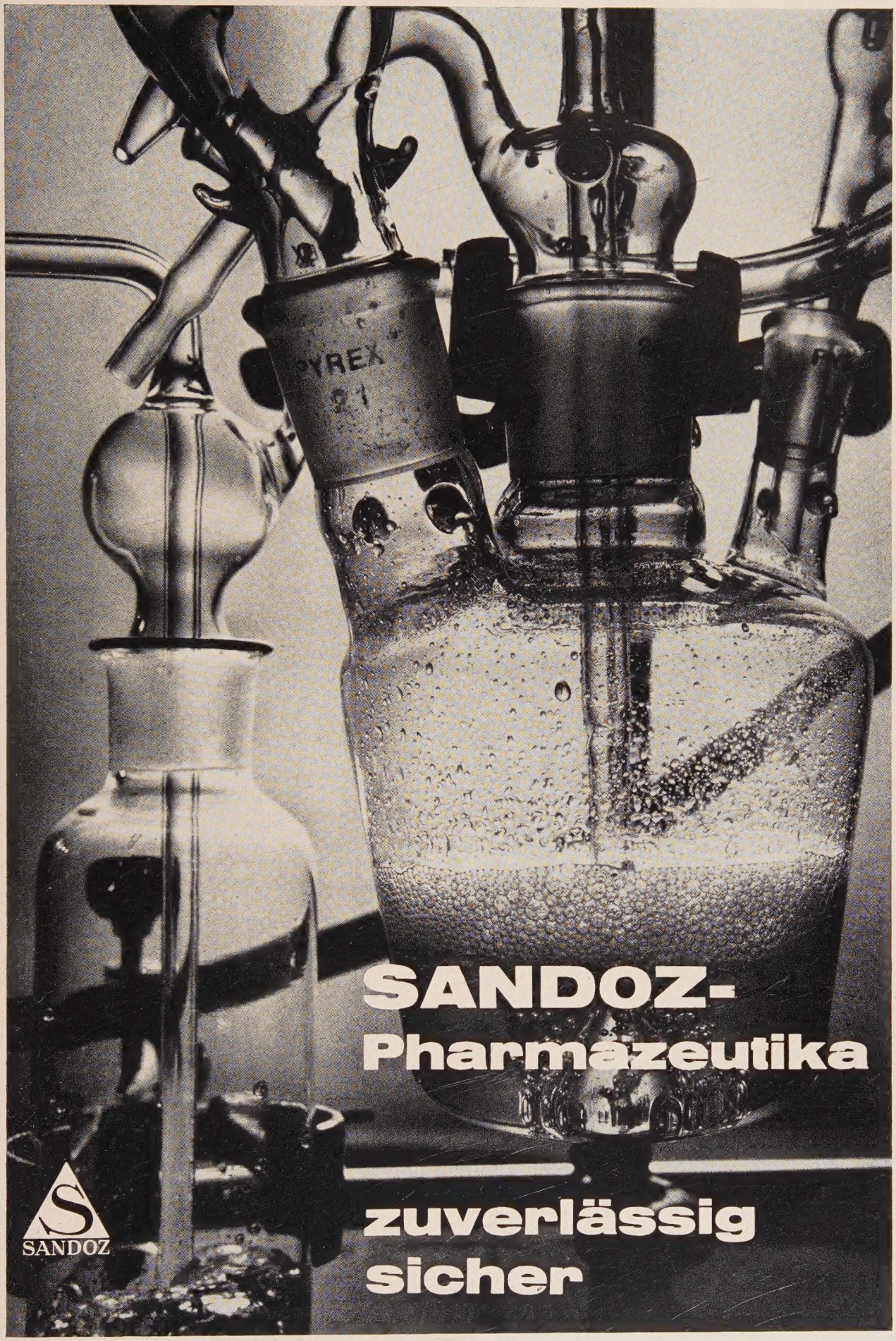
La Société Chimie Physique consacrera sa onzième réunion anuelle à une discussion sur le sujet suivant: l'acide désoxyribonucléique (ADN) structure, synthèse et fonction.
La réunion aura lieu à l'hôtel du Col de Voza, Haute-Savoie (1700 m) au-dessus de Chamonix-Mont-Blanc, du 26 au 30 juin 1961.
Pour tous renseignements s'adresser au secrétaire général, Prof. G. Emschwiller, Ecole supérieure de Physique et de Chimie, 10, rue Vauquelin, Paris Ve.

USA

XVIth International Congress of Zoology

Washington, D.C., August 21–27, 1963

The XVIth International Congress of Zoology will be held in Washington, D.C., August 21–27, 1963, under the presidency of Dr. Alfred S. Romer, Alexander Agassiz Prof. of Zoology and Director of the Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.


PYREX
2 l
SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

WENEVER
SAY "NO"

WE SHIP YOUR
ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000
CHEMICALS FOR
IMMEDIATE DELIVERY
FROM STOCK.
LARGEST VARIETY
ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

Konstitution und Vorkommen
der organischen Pflanzenstoffe
(excl. Alkaloide)

VON DR. W. KARRER RIEHEN BEI BASEL

Chemische Reihe, Band 12
Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

1207 Seiten. Preis gebunden Fr./DM 136.–

Inhalt: Kohlenwasserstoffe – Alkohole, Phenole, Naphthole – Stilbene – Aldehyde – Ketone (incl. Oxyde) – Tropolone – Kohlenhydrate – Carbonsäuren – Säureamide – Depside, Depsidone – Lactone – Lignane – Chinone – Anthrachinone (incl. Anthrone und Anthranole) – *a*-Pyronderivate (insbesondere Cumarine) – *y*-Pyronderivate (Nichtkondensierte *y*-Pyronderivate, Chromone, Flavanoide Verbindungen, Xanthone) – *a*-Pyranderivatr (Benzopyrane = Chromane, Anthocyane und deren Aglykone) – Flavane – Furanderivate – Carotinoide – Sesquiterpene (incl. Azulene) – Diterpene – Triterpene – Sterine –Steroide Saponine und deren Aglykone – Digitaloide Glykoside und deren Aglykone – Schwefelhaltige Verbindungen – Cyanide, cyanogene Glykoside – Aminosäuren, Betaine, Peptide – Amine – Phosphatide – Pyrrol, Indol und deren Derivate – Einfache Derivate von Pyridin, Piperidin, Chinolin, Pyrazin, Phenazin – Pyriminide, Purine, Pterine – Nucleoside, Nucleotide – Phytohormone, Pflanzenwuchsstoffe – Vitamine – Cofermente – Verschiedene Verbindungen

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL/STUTTGART

Medicina Experimentalis

Internationale Zeitschrift für experimentelle Medizin

International Journal of Experimental Medicine

Journal International de Médecine expérimentale

Editores: R. **Domenjoz** Bonn – C. H. Best, Toronto – B. B. Brodie, Bethesda, Md. – J. Cheymol, Paris – L. Heilmeyer, Freiburg i. Br. – A. Vannotti, Lausanne.

Medicina Experimentalis erscheint in Heften von ca. 64 Seiten. 6 Hefte bilden einen Band zum Abonnementspreis von sFr. 56.– inkl. Porto (jährlich erscheinen 2 Bände). Publikationssprachen sind Deutsch, Englisch, Französisch. Jeder Originalarbeit wird eine Zusammenfassung in diesen Sprachen beigegeben.

Medicina Experimentalis appears in numbers of approximately 64 pages. One volume consists of 6 numbers (two volumes annually); the subscription price per volume is Swiss francs 56.–, postage included. Papers must be submitted in either English, German or French. Each original paper will be followed by summaries in this languages.

Medicina Experimentalis paraît en fascicules d'environ 64 pages. Six fascicules forment 1 volume (2 volumes par an). Le prix d'abonnement d'un volume est de fr.s. 56.–, franco. Les langues de publication admises sont le français, l'anglais et l'allemand. Chaque travail original sera résumé dans ces langues.

Aus dem Inhalt der ersten Hefte

From the Contents of the first numbers

Du contenu des premiers fascicules

GARRETT, J. und OSSWALD, W. (Porto): Über die Wirkung des Phentolamins (Regitin) auf para-sympathische Nerven. CUTTING, W. and CUTTING, M. (Stanford, Cal. USA): Host Influences in the Initiation of Malignancy. THEOBALD, W. (Basel): Der Ablauf einer konditionierten Fluchtreaktion der Ratte nach kombinierter Behandlung mit Tofranil^{R} und Reserpin. FROMMEL, ED., FLEURY, C. et SCHMIDT-GINZKEY, J. (Genève): Méprobamate et morphine. De leurs antagonismes. MÖRSDORF, K. und FEHRES, L. (Bonn): 5-Hydroxytryptamin (5-HT) und hyperergische Reaktion. CARLIER, J., LEJEUNE-LEDANT, G. et KEIL, CH. (Liège): 5-Hydroxytryptamine, lésions vasculaires pulmonaires et pression artérielle pulmonaire. SELYE, H., LEMIRE, Y. and CANTIN, M. (Montreal): Topical Blockade of Carbon Angiotaxis by Cortisol. RONDEZ, R., RÜTTNER, J. R. und ANDERS, G. (Zürich): Mastzellreaktion nach Einwirkung von Quarz in isotoner und nicht isotoner Suspension im Intraperitonealversuch bei der Maus. PANAGOPOULOS, C., PANAGOPOULOU-PANOUTSOU, H., SEKERIS, C. and HARALAMPIDES, A. (Athen): Biological Acylations. 4th Report. Action of Vitamin D on the In Vivoacetylations. LABORIT, H., NIAUSSAT, P., BROUSSOLLE, B. et JOUANY, J. M. (Paris): Exposé de résultats expérimentaux concernant certaines propriétés originales de la sérotonine. HABERLAND, G. L. (Wuppertal-Elberfeld): Über die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit bei der Therapie experimenteller Entzündungsmodelle mit Antiphlogistica (I. Prednison).

Verlangen Sie Probehefte *Ask for specimen copy* *Demandez des numéros spécimen*

S. Karger Basel New York